

Departamento de Biología Molecular
Facultad de Ciencias
Universidad Autónoma de Madrid



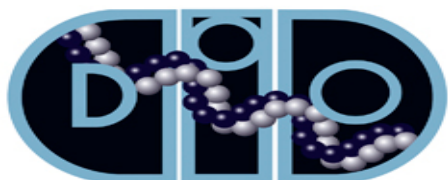
Actividad de la Hormona de Crecimiento
en el
Desarrollo de Enfermedades Autoinmunes

Tesis Doctoral
Dimitri Kakabadse
Madrid, 2013

Este trabajo ha sido realizado en el Centro Nacional de Biotecnología en el
Departamento de Inmunología y Oncología bajo la dirección de los:

Doctores Ricardo Villares y Mario Mellado

Esta tesis ha sido realizada en el Departamento de Inmunología y Oncología (DIO) del Centro Nacional de Biotecnología, y ha sido financiada por la beca de la fundación “La Caixa”.



AGRADECIMIENTOS

Después de este camino recorrido, quiero dedicar esta sección a la gente que me ha ayudado, acompañado y apoyado durante estos años.

En primer lugar quiero dar las gracias a mi Director de tesis Mario Mellado, por haberme dado la oportunidad de realizar la tesis en su laboratorio, por hacerme comprender el mundo de la inmunología, y por todo el apoyo que a mostrado, su interés, y sus siempre bienvenidos tirones de orejas, cuando fuera conveniente.

A Ricardo Villares mi co-director de tesis, por haberme enseñado, guiado, y sobre todo aguantarme. Es una de las personas a la cual respeto por su calidad como investigador, por todo su conocimiento y sus enseñanzas.

A mi grupo de laboratorio, por su invaluable apoyo durante estos años. A Pili por ser como una madre en el laboratorio, por defendernos y animarnos. José Miguel, por ser de los que anima el laboratorio. A Laura M por ser una persona muy especial, todo un modelo a seguir, además, por animarnos, y siempre estar ahí para todos nosotros. Graciela, aunque me digas despegado, místico agresivo, y más cosas, pero durante estos años he ganado más que una compañera del labo una amiga. Rubén una gran amigo, con quien he compartido debates, vinos, cervezas, retos y siempre picándonos por el futbol, te agradezco los años compartidos en el labo, seguramente nos encontraremos de nuevo, ánimos Crack!!!. Laura B una amiga a la cual respeto mucho por ser directa y sincera, por apoyarme en los debates de futbol con Rubén, y ser alguien que siempre esta dispuesta a ayudar. Yolanda una investigadora que admiro por su capacidades y lo ha demostrado al obtener una plaza de investigadora, ánimos y sigue luchando!!!.

A la gente que ya no está en el labo pero no menos importantes, ya que han sido parte importante de mi formación. A Borja muchas gracias por esas charlas en los pasillos. A Julia por darme ánimos y siempre estar pendiente. A Bea a quien la considero una gran amiga y por todo ese apoyo fuera del labo. A Sofía y Anabel dos chicas estupendas que alegraron el ambiente del labo. A Coloma y Cris por su amistad. Y a Ana, Vero y Gema con quienes coincidí muy poco tiempo solo puedo agradecerles por haber estado ahí!!!.

A la gente del DIO, sois todos como una gran familia, en donde cualquier persona que entra se siente integrado, durante su estancia en este departamento, realmente todos son excelentes profesionales, y muchos de ustedes se han convertido en grandes amigos. La gente del 412, Gorjana, Katty, por nuestras discusiones. A Jorge 412 por esos ánimos que siempre te daba al cruzarte por los pasillos. A Javi, por esas charlas en el tren por las mañanas, y los cafés de la tarde, gracias por escuchar. A Vicen, por sus

ocurrencias y hacer de nuestras vidas más alegres. A Pedro, por ser uno de los fundadores de las cañas de los miércoles, por generar temas de discusión, y organizar los eventos del DIO. A Gema por esas charlas por las tardes. Sheila y Eva por su apoyo y ánimos, además, por saber llevar el espíritu de este departamento. Al labo 415, Rosa, Lorena, Juan Carlos muchos éxitos. Miriam, Gema, Gloria y Daniela por ser un grupo muy alegre y siempre tener chuches para cuando tenía hambre, gracias!!! A Roberto por esas charlas en la cafetería, y sus impresiones sobre las mismas.

A los servicios del DIO, Antonio por siempre estar pendiente de nuestros pedidos y darnos las collejas respectivas de los cumpleaños, y más que nada por tu interés en todos nosotros, fue un placer haber coincidido contigo. A Coral nuestra salvadora para cualquier trámite administrativo. Anabel por guiarnos en nuestros primeros pasos por los microscopios, Ma. Carmen, Sonia y Pablo por el servicio de citometría. Sara quien me ayudo en citometría; y por supuesto por ayudarme en los videos de tesis. Sin olvidar a Lucio, que le debo mucho por todos estos años en el animalario, sin ti, gran parte de esto no sería posible, gracias.

La gente del DIO que ya no esta también tienen un espacio importante, a Denise por todas esas charlas en citometría, siempre me has animado, muchas gracias.

Mis compañeros de piso, que han sido muchos durante estos años, y con algunos de ellos hemos forjado una amistad duradera, y que me ayudo a sobrellevar la distancia de mi hogar.

A mi familia a quienes les debo todo, por su apoyo, y su gran paciencia..., sé que la distancia no es fácil de sobrellevar pero sin ustedes no podría haberlo logrado. A mí madre que a luchado siempre por mí, y me llevó a ser lo que soy a ahora. Su guía fue esencial, para mi crecimiento y formación, pero esto se lo dedico. A mi padre por su guía y el estar pendiente mi. A mis hermanas que han sido un soporte vital, les agradezco un sin fin de cosas. Y a mis sobrin@s que siempre están para sacarme una sonrisa.

En fin, gracias a todos, hay cosas que no puedo decir aquí, no por censura, sino porque no hay palabras para agradecerles!!!.

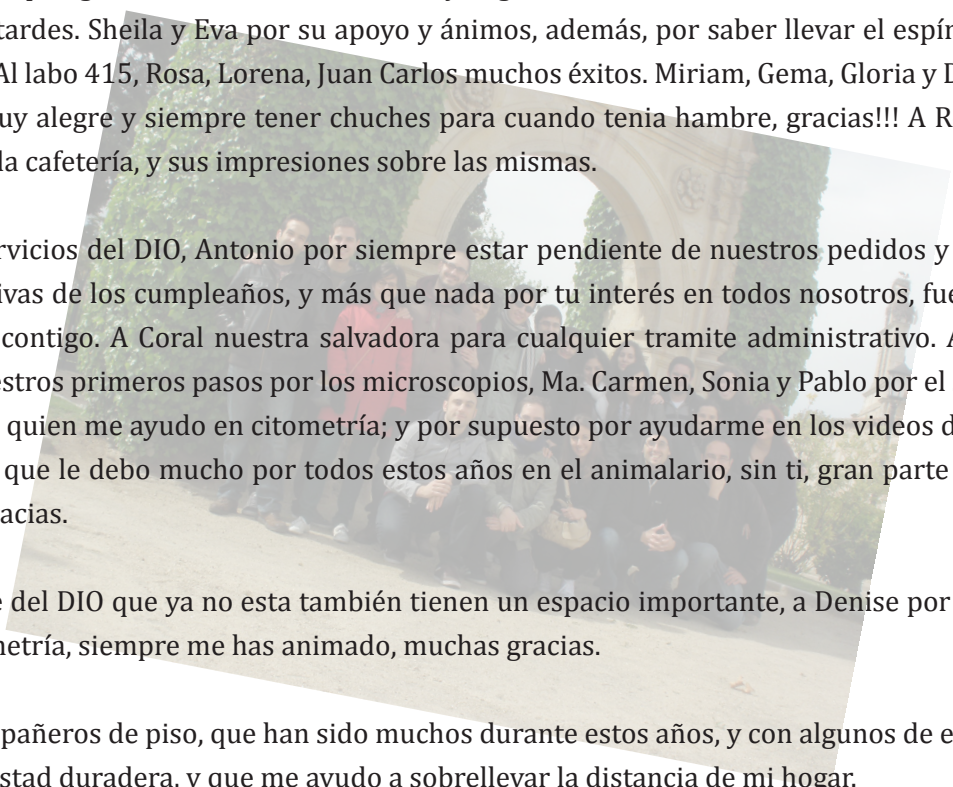


TABLA DE CONTENIDOS

ABREVIATURAS	17
RESUMEN	21
SUMMARY	22
I. INTRODUCCIÓN.....	25
1.- Sistema Inmune	25
1.1.- Inmunidad Innata	25
1.1.1.- Células Dendríticas (DC)	25
1.1.2.- Macrófagos	26
1.1.3.- Células NK	26
1.1.4.- Células T $\gamma\delta$	26
1.1.5.- Complemento	26
1.1.6.- Interferones	27
1.2.- Inmunidad Adquirida	27
1.2.1.- Células B	28
1.2.2.- Células T	28
1.2.2.1.- Polarización de linfocitos Th	29
1.2.2.1.1.- Subtipo celular Th1	30
1.2.2.1.2.- Subtipo celular Th2	30
1.2.2.1.3.- Células Th17	30
1.2.2.1.4.- Células T reguladoras	30
1.2.2.1.5.- Subtipo celular TFH	31
1.2.2.- Respuesta humoral	31
2.- Tolerancia	32

3.- Autoinmunidad	32
3.1.- Diabetes tipo 1	32
3.2.- Inmunoterapia	33
4.- Neuroendocrinología	35
4.1.- GH-Efectos sobre el sistema inmune	35
4.1.2.- Regulación de GH	36
5.- Modelo de ratón transgénico para hormona de crecimiento.....	37
6.- Páncreas y células β productoras de insulina	37
6.1.- Condiciones fisiológicas del páncreas endocrino	37
7.- Modelo ratón NOD	39

II. OBJETIVOS	43
---------------------	----

III. MATERIALES Y MÉTODOS	47
---------------------------------	----

1.1.- Ratones	47
1.1.1.- Diseño del ratón transgénico NOD-bGH	47
2.- Diagnostico de la diabetes	47
3.- Anticuerpos y Oligonucleótidos	47
4.- Inmunohistoquímica	50
4.1.- Procesado del tejido en criostato	50
4.2.- Tinción inmunohistoquímica	50
4.3.- Determinación de la masa de las células β y niveles de infiltración	51
5.- Ensayo de Hipersensibilidad Retrasada	52
6.- Cuantificación de los anticuerpos y citoquinas	52
6.1.- Ensayo de Inmunoabsorción Ligada a Enzima (ELISA)	52
6.2.- Cuantificación de citoquinas	53
7.- Transfer Adoptivo	53
8.- Análisis de apoptosis en islotes de Langerhans	53
9.- Purificación de células T	53
9.1.- Purificación de células B	54
9.2.- Purificación de infiltrados pancreáticos	54
10.- Citometría de flujo	54
10.1.- Marcaje extracelular	54
10.2.- Marcaje extracelular en sangre	55

10.3.- Marcaje intracelular	55
11.- Ensayos <i>In-vitro</i>	55
11.1.- Ensayos de proliferación	55
11.2.- Ensayos de supresión <i>In-vitro</i>	55
11.3.- Ensayos de activación de células B	55
12.- Ensayos de apoptosis inducida por estreptozotocina (STZ).....	56
13.- Técnicas de Biología Molecular	56
13.1.- Lisados celulares totales	56
13.2.- Separación electroforética y análisis por Western Blot	56
13.3.- Aislamiento de ARN total	57
13.4.- Síntesis de ADN complementario	57
13.5.- RT-qPCR (PCR cuantitativa a tiempo real)	57
14.- Tampones y medios de cultivo	58

IV. RESULTADOS 61

1.- Efectos de la sobreexpresión de GH circulante en el ratón NOD.....	61
1.1.- Análisis histológico del páncreas	62
1.2.- Composición de los infiltrados pancreáticos	66
2.- Síntomas pre-clínicos en el ratón NOD-bGH	68
2.1.- Integridad estructural de los islotes pancreáticos	69
2.2.- Funcionalidad de las células β	70
3.- GH circulante responsable del fenotipo protector	72
4.- Potencial supresor del ratón NOD-bGH	79
5.- Efecto de la GH en la polarización de los macrófagos	83
6.- GH modula la plasticidad Th1 en el desarrollo de la diabetes tipo 1....	84

V. DISCUSIÓN 89

VI. CONCLUSIONES..... 99

VII. BIBLIOGRAFÍA 103

VIII. ANEXOS..... 113

ABREVIATURAS

Abreviación	Definición
Ab	anticuerpo (del inglés “antibody”)
AIRE	regulador autoinmne (del inglés “ autoimmune regulator”)
Arg-1	arginasa 1
ARN	ácido ribonucleico
bGH	hormona de crecimiento bovina (del inglés “bovine growth hormone”)
BSA	albúmina de suero bovino (del inglés “bovine serum albumin”)
Ct	umbral de detección (del inglés “threshold cycle”)
DAB	3,3’ diaminobencidina (del inglés “3,3’-Diaminobenzidine”)
DNA	ácido desoxirribonucleico
DNA	ADN complementario
DTH	tipo de hipersensibilidad retardada (del inglés “delayed type hypersensitivity”)
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
ELISA	Ensayo de Inmunoabsorción Ligado a Enzima (del inglés “Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay”)
FBS	suero de ternera fetal (del inglés “epidermal growth factor”)
FoxP3	factor de la regulación P3 (del inglés “forkhead box P3”)
GH	hormona de crecimiento (del inglés “growth hormone”)
GHR	receptor de la hormona de crecimiento (del inglés “growth hormone recpetor”)
Gy	Gray
H&E	hematoxilina & Eosina
HBSS	solución salina balanceada de Hank (del inglés Hank’s Balanced Salt Solution”)
HEPES	ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazina etanolsulfónico
HRP	peróxido de rabáno (del inglés “horse raddish peroxidase”)
IFN	interferón (del inglés “interferon”)
IGF-1	factor de crecimiento insulínico tipo 1 (del inglés “insulin growth factor I)
IL	Interleuquina
iNOS	óxido nítrico sintasa (del inglés “Inducible nitric oxide synthase “)
JAK	quinasa de la familia JANUS (del inglés “JANUS kinase”)
mAb	anticuerpo monoclonal (del inglés “monoclonal antibody”)
MHC	complejo mayor de histocompatibilidad (del inglés “mayor histocompatibility complex”)
mRNA	ácido ribonucleico mensajero
NOD	ratón diabetico no obeso (del inglés “non-obese diabetic”)
OVA	ovoalbúmina

PAGE-SDS	electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (del inglés “polyacrilamide gel electrophoresis-sodium dodecyl sulfate”)
PBS	tampón fosfato salino (del inglés “phosphate buffered saline”)
PCR	reacción en cadena de la polimerasa (del inglés “Polymerase Chain Reacción”)
PDX-1	factor pancreático y duodenal 1 (del inglés “pancreatic and duodenal homeobox 1”)
PECK	fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (del inglés “Phosphoenolpyruvate carboxykinase”)
PFA	paraformaldehído (del inglés “paraformaldehyd”)
qPCR	PCR cuantitativa (del inglés “cuantitativa PCR”)
SOCS	supresores de la señalización por citoquinas (del inglés “suppressor of cytokine signaling”)
STAT	factor activador de la transcripción de señales y la transcripción (del inglés “signal transducers and activators of transcription”)
SZT	estreptozotocina (del inglés “streptozotocin”)
TA	temperatura ambiente
TBST	tampón tris-salino twenn (del inglés “tris buffered saline twenn20”)
Teff	células T efectora (del inglés “T effector cell”)
Th	células cooperadora (del inglés “T helper”)
TNB	tampón de bloqueo tris salino (del Ingles “Tris NaCl blocking buffer”)
TNF	factor de necrosis tumoral (del inglés “tumor necrosis factor”)
Treg	células T reguladoras (el inglés “regulator T cell”)
μCi	micro curio (del inglés “micro Curie”)

RESUMEN

Durante años se han establecido diversos efectos del sistema neuroendocrino sobre el desarrollo y función del sistema inmune. Sin embargo el particular efecto de las hormonas somatotrópicas, ha sido poco estudiado, restringiéndose muchas veces ese análisis a su papel en la hiperactivación de células linfoides o en la producción de citoquinas. En este proyecto hemos estudiado el efecto de la hormona de crecimiento en el desarrollo de la diabetes tipo 1. Esta enfermedad autoinmune que afecta a más de 20 millones de personas en el mundo se caracteriza por una insuficiente producción de insulina por parte de las células β , lo que provoca el acúmulo de glucosa en circulación. La línea de ratones NOD (Non-obese diabetic) desarrolla T1D de manera espontánea y es uno de los modelos más empleados para el estudio de esta enfermedad. En nuestro laboratorio, sobre el fondo genético NOD, hemos desarrollado una línea de ratones transgénicos para GH bovina (NOD-bGH), que permita estudiar como la presencia de niveles constantes de GH circulante influye en el desarrollo de la diabetes tipo 1. Los ratones NOD-bGH son completamente resistentes a la patología. El estudio del mecanismo responsable de esa resistencia implica una menor apoptosis y mayor proliferación de las células β en los ratones NOD-bGH y un efecto de la hormona sobre la presentación antigénica que explica la no detección de autoanticuerpos en estos ratones, sobre la polarización de macrófagos que en estos ratones son fundamentalmente M2 antiinflamatorios, sobre las células T reguladoras donde detectamos que la GH incrementa los niveles de FoxP3 y la capacidad de supresión y finalmente sobre la plasticidad de las células Th17 al inhibir su transformación hacia células Th1. Estos resultados vinculan a la GH con un papel esencial en la respuesta inmunitaria y la identifican como una diana de interés para el tratamiento de la diabetes tipo 1.

SUMMARY

Various neuroendocrine effects on development of the immune system have been known for decades. Nonetheless, the individual effect of somatotrophic hormones has been little studied, and analysis is often restricted to its role in lymphoid cell hyperactivation and cytokine production. In this project, we analyzed the effect of growth hormone (GH) on the development of type 1 diabetes (T1D). T1D is an autoimmune disease that affects more than 20 million people worldwide; it is characterized by insufficient insulin production by pancreatic β cells, which results in the deleterious accumulation of circulating glucose. The non-obese diabetic (NOD) mouse strain develops spontaneous T1D and is one of the most widely used animal models for the research on this disease. In our laboratory, we developed a transgenic mouse strain for bovine GH (NOD-bGH) on the NOD genetic background, which allows study of how constant levels of circulating GH influence T1D development. NOD-bGH mice are completely resistant to the disease; we therefore studied the mechanism responsible for this phenomenon. We found mechanisms that lead this resistance in NOD-bGH mice that involves lower apoptosis and increased proliferation of β cells compared to control littermates. The absence of autoantibodies in the mice, explained as a GH effect on antigen presentation. Macrophage polarization in NOD-bGH mice leads to an essentially anti-inflammatory M2 phenotype. Finally, we show plasticity of non-pathogenic Th17 cells that avoid conversion into pathogenic Th1 cells. These results identify a key role for GH in the immune response and pinpoint this hormone as a target of interest for treatment of type 1 diabetes.

I.- INTRODUCCIÓN

Diversos estudios han analizado el efecto del sistema neuroendocrino sobre el desarrollo y función del sistema inmune (Welniak et al. 2002). Sin embargo, el efecto del sistema endocrino sobre la regulación de las respuestas autoinmunes asociadas a hormonas somatotrópicas, ha sido poco estudiado, restringiéndose en todo caso al papel de la hiperactivación de células linfoides o en la producción de citoquinas (Gonzalo et al. 1996).

1.- Sistema Inmune

El sistema inmune tiene la función de proteger al organismo frente a agresiones, infecciones y tumores e implica diversos tipos celulares y diferentes moléculas. Cualquier sustancia propia o ajena capaz de promover una respuesta inmunitaria y desencadenar la formación de anticuerpos es definida como un antígeno y para llevar a cabo una respuesta efectiva el sistema inmune actúa mediante dos líneas de defensa diferentes que sin embargo cooperan y se coordinan entre sí: la respuesta innata y la adquirida (Schumacher et al. 2010).

1.1.- Inmunidad Innata

La respuesta innata es muy rápida, casi inmediata contra el patógeno. Está siempre presente en los organismos y está constituida por barreras anatómicas (físicas, químicas, biológicas), por células fagocíticas y por las sustancias que éstas liberan. La respuesta no genera memoria inmunológica (Abbas & Lichtman. 2010). Entre los componentes celulares destacan macrófagos, células dendríticas, células T $\gamma\delta$ y células NK, mientras que el sistema del complemento o los interferones (IFN) constituyen el componente humoral.

1.1.1.- Células Dendríticas (DC)

Las células dendríticas, junto con los macrófagos y los linfocitos B, conforman el grupo de células presentadoras de antígenos (APC), células que capturan y presentan antígenos a los linfocitos T además de ser críticas para iniciar la respuesta del sistema adaptativo y el mantenimiento de la tolerancia central y periférica (Gupta & Louis 2013; Merad

et al. 2013). Los antígenos capturados son transportados a los ganglios linfáticos donde serán reconocidos por células T específicas. De esta presentación dependerá la respuesta inmune que se produzca. Así, las DC influyen directamente en la diferenciación final de las células CD4⁺ en los subtipos celulares Th1, Th2, Th17, Treg (Rissoan 1999; Turner et al. 2009).

1.1.2.- Macrófagos (Mø)

Los macrófagos son células que se diferencian en los tejidos desde monocitos circulantes. Son también células capaces de fagocitar y presentar antígenos. Pueden fagocitar grandes partículas procedentes de organismos destruidos como bacterias y parásitos (Fairweather et al. 2009) y además también participan en la remodelación de algunos órganos como por ejemplo, el páncreas (Tessem et al. 2008). Dependiendo del contexto en que se diferencien, existen macrófagos tipo M1 o inflamatorios y M2 o antiinflamatorios. Los primeros se originan al ser activados por lipopolisacáridos (LPS) bacterianos o por interferón (IFN)- γ , mientras los M2 se originan al estimularse por IL-4 o IL-13. (Lumeng et al. 2007). De hecho el equilibrio que existe entre macrófagos M1 y M2 puede a veces romperse y originar patologías inflamatorias asociadas al exceso del número macrófagos M1 o, deficiencias por la falta de supresión del fenotipo M2 (Solinas et al. 2009), como se ha demostrado en el laboratorio para algunas enfermedades algunas autoinmunes como encefalomiелitis alérgica experimental (EAE), artritis inducida por colágeno, o diabetes tipo 1 (Fairweather et al. 2009). Por otra parte, los macrófagos asociados a tumores (TAM) tienen

características M2 y un desequilibrio a su favor se relaciona con el desarrollo de tumores (Galdiero et al. 2013).

1.1.3.- Células NK

Las células NK (natural killer) son linfocitos con actividad citotóxica sobre aquellas células que no presentan complejo de histocompatibilidad de tipo I (MHC-I), proteínas presentes en las células sanas del organismo (Long et al. 2013). Las células NK han sido relacionadas con los procesos autoinmunes, en el caso de la diabetes tipo 1, por ejemplo, se ha observado que una sobreexpresión del ligando para el receptor de la célula NK (NKG2D) en el páncreas co-estimular a las células CD8⁺ autoreactivas e induce la enfermedad (Ogasawara et al. 2003).

1.1.4.- Células T $\gamma\delta$

Son células T que pueden reconocer proteínas intactas, moléculas orgánicas e incluso antígenos intactos sin ser presentados por el MHC (Sutton et al. 2012). La mayoría no expresan CD4, ni CD8, se suelen localizar en los epitelios y no recirculan a los ganglios linfáticos. Por su localización se las ha atribuido un papel como primera línea de defensa. Su deficiencia se ha relacionado por ejemplo con una mayor susceptibilidad a padecer cáncer de piel. Por otro lado, son células productoras de IL-17, citoquina clave en algunos procesos autoinmunes como la diabetes tipo 1, artritis reumatoide, ó esclerosis múltiple (Markle et al. 2013; Han et al. 2010)

1.1.5.- Complemento

Como respuesta alternativa por parte del

sistema innato para destruir agentes infecciosos, el sistema de complemento juega un papel relevante, causando la lisis de células infectadas y facilitando los procesos de fagocitosis de partículas. Es un sistema complejo formado por más de 30 proteínas plasmáticas, la mayoría producidas por hepatocitos, que se encuentran en circulación en su forma inactiva, hasta recibir alguna señal de activación. La **ruta clásica** implica su activación cuando un anticuerpo ese une al patógeno, y la **ruta alternativa** implica la activación estimulada por proteínas que se adhieren a la superficie del patógeno. Sin embargo ambas rutas convergen en la activación de la proteína C3, esencial para el sistema del complemento (Sarma & Ward 2011).

1.1.6.- Interferones

La respuesta del sistema innato, además de reconocer patógenos y eliminarlos, genera moléculas efectoras denominadas interferones, con un alto grado de especificidad para promover y regular respuestas inmunes. La inducción de la producción de interferones es regulada por células tales como, células T, células B, macrófagos o fibroblastos (Hertzog et al. 2011).

1.2.- Inmunidad adquirida

El sistema adaptativo se requiere para una apropiada protección contra patógenos externos y cualquier molécula que estos produzcan. Se trata de una respuesta altamente específica frente a un antígeno o grupo de ellos, y otorga una protección de larga duración porque genera memoria inmunológica (Abbas & Lichtman 2010).

El reconocimiento de antígenos patogénicos desencadena una respuesta en la

que el antígeno es procesado y transportado a órganos linfoides por células dendríticas. Allí es presentado a células T para promover su activación (Schumacher et al. 2010). El componente celular lo constituyen los linfocitos B y T, a los que se unen como componentes humorales los anticuerpos y las citoquinas. Es por ello una respuesta muy elaborada y lenta que requiere la participación coordinada de varios tipos celulares (Broere et al. 2011).

Los linfocitos son capaces de generar respuestas específicas contra un número casi infinito de antígenos. Esta versatilidad en la respuesta responde a mecanismos genéticos únicos que permiten la generación de poblaciones diversas de células T y B, en la que cada una porta en su superficie un único receptor, que reconoce un antígeno específico (el receptor de células T, TCR y el BCR o receptor de células B, respectivamente) (Von Andrian & Mackay. 2000). La suma de todas estas células permite en teoría hasta 10^{18} patrones diferentes de reconocimiento en humanos y define el repertorio inmunológico necesario para responder a los diferentes patógenos que encontraremos a lo largo de la vida.

Durante su desarrollo, las células T y B que expresan receptores funcionales en su superficie son controladas y seleccionadas positivamente y, a continuación, pasan otro punto de control donde se seleccionan negativamente aquellas células que reconocen antígenos propios, limitando así la aparición de reacciones autoinmunes (Maggi et al., 2005). Los linfocitos maduros así seleccionados están en continuo movimiento por el organismo. Los linfocitos vírgenes residen temporalmente en los órganos linfoides secundarios (bazo, ganglios,

placas de Peyer) que están estratégicamente localizados a lo largo del cuerpo (Mondino et al. 1996). Desde estas estructuras las células vuelven a la sangre cuando es necesario en un proceso conocido como recirculación linfocitaria (von Andrian & Mackay 2000; Smith-Garvin et al. 2009). Los antígenos son canalizados a los órganos linfoides secundarios vía sangre o linfa en forma soluble o presentados como pequeños péptidos por el complejo mayor de histocompatibilidad sobre la superficie de las células presentadoras de antígeno. A la activación celular sigue una fase de expansión clonal de las células T y B generando una descendencia de células con idéntica especificidad por el antígeno. Son células efectoras que se dirigirán a los tejidos no linfoides guiadas por señales inflamatorias locales (von Andrian & Mackay 2000). La mayoría de esas células efectoras mueren tras atacar el patógeno, sin embargo algunas se mantienen como células de memoria, protegiendo al organismo de infecciones recurrentes por el mismo patógeno (Schumacher et al. 2010).

1.2.1.- Células B

Las células B se originan en la médula ósea a partir de células madre hematopoyéticas. En el estadio inmaduro, las células B, ya expresan el BCR, en realidad una IgM. Por otro lado las células B sufren un proceso de selección negativa en el cual las células autoreactivas son eliminadas. Las células no autoreactivas, se diferencian entonces a células B maduras que salen de la médula ósea y recirculan por el organismo entrando en los órganos linfoides secundarios, principalmente bazo y ganglios linfoides, donde terminan su diferenciación y buscan su antígeno específico (Hampe 2012). Las células B maduras pueden

ser activadas por el reconocimiento entre una célula T cooperadora y la célula B antígeno-específica, es la actuación conocida como **activación dependiente de células T**, o a través del reconocimiento directo de la célula B de polisacáridos bacterianos, glicoproteínas, moléculas de superficie de varios patógenos, sin la necesidad de que el antígeno sea procesado. Se trata de un mecanismo mediado por otras células, **independiente de células T**. En ambos casos la célula B activada y acompañada de otras señales estimuladoras comienza a producir grandes cantidades de anticuerpos específicos frente al antígeno y pasa a llamarse célula plasmática, que juega una función clave en la respuesta inmune humoral (Mauri & Bosma 2012).

1.2.2.- Células T

Los linfocitos T están en constante movimiento desde el torrente sanguíneo hasta los órganos linfoides secundarios, donde se encuentran con el antígeno presentado por las APC a través del complejo MHC de clase I en el caso de las células CD8⁺ ó citotóxicas o del complejo MHC de clase II en el caso de las células CD4⁺ ó cooperadoras. Se produce entonces una señal de supervivencia en las células T que se convierte en señales proliferativas en presencia de señales coestimuladoras, originadas por la unión de CD28 en la célula T y CD80/CD86 en la superficie de la célula presentadora. Sin estas señales coestimuladoras la célula T es incapaz de responder correctamente al estímulo del TCR, y entra en un estado de anergia (Smith-Garvin et al. 2009). La expansión clonal será quien garantice la respuesta frente al antígeno específico. Las células T CD4⁺ efectoras activan macrófagos, células B, etc., y las células CD8⁺ efectoras tienen actividad citotóxica.

La expansión clonal es controlada por procesos de apoptosis mediada por el ligando Fas y por la expresión de CTLA-4 que compite con CD80 por la coestimulación. Tras la activación, algunas células T $CD4^+$ y $CD8^+$ no mueren y se convierten en células T de memoria, que se caracterizan por tener una larga vida y posibilitar una rápida respuesta ante la reinfección.

1.2.2.1.- Polarización de los linfocitos Th

En función del tipo de patógeno y, por lo tanto, de la presentación antigénica, las células T cooperadoras (Th) se polarizan. El proceso es mediado por la secreción de citoquinas por parte de las células presentadoras y otras células presentes, NK, basófilos, mastocitos, etc. (Gutcher, 2007), cada combinación de citoquina activa un determinado proceso de diferenciación que inhibe el de otros grupos.

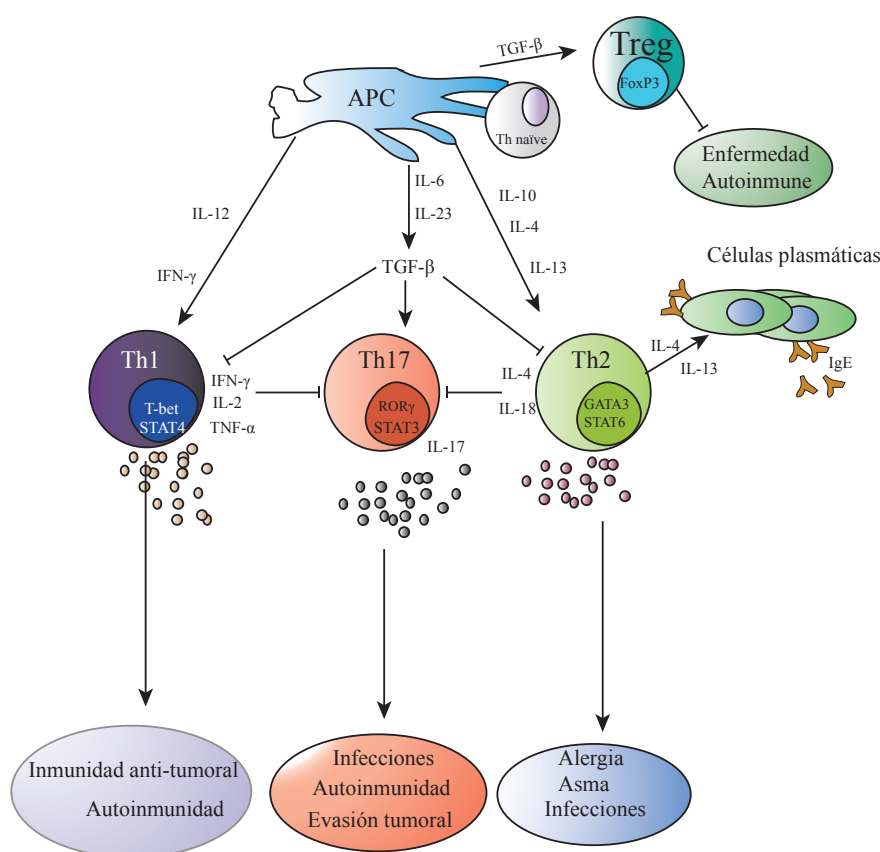


Figura 1.- La presentación antigénica sobre células T $CD4^+$ naíve con una APC se pueden distinguir dos subtipos funcionalmente diferenciados, las células Th1, estimuladas por IL-12 y IFN- γ , para enfrentar una respuesta anti-tumoral, o mediante la liberación de citoquinas una respuesta pro-inflamatoria, y células Th2, estimuladas por IL-10, IL-4, IL-13, y que además pueden estimular un cambio de isotipo en células plasmáticas para secretar IgE mediante IL-4, IL-13. Sin embargo, una desregulación del equilibrio entre la inmunidad de tipo Th1 y Th2 puede causar varias enfermedades inmunes tales como enfermedades inflamatorias autoinmunes y alergias. Además, las Th17 un tercer subtipo de células T $CD4^+$ inducidos por TGF- β , IL-6 e IL-23, que están estrechamente relacionados con varias enfermedades autoinmunes tales como la diabetes, artritis reumatoide, artritis. Las células Treg son estimuladas por TGF- β liberada en la presentación antigénica y su actividad consiste en regular las respuestas inmunes.

Algunos de los existentes son células Th1, Th2 ó Th17 que están inmersas en las respuestas inflamatorias, y también en el mantenimiento de la tolerancia periférica y en los procesos de supresión inmune (Broere et al. 2011) (**fig.1**).

1.2.2.1.1- Células Th1

Los linfocitos Th1 se caracterizan por producir IL-2 e IFN- γ y por expresar el factor de transcripción T-bet. Se originan por la presentación de antígenos de patógenos intracelulares, cuando el reconocimiento se produce en presencia de IL-12 e IFN- γ (Heinzel et al. 1989). De hecho, IL-12 es fundamental para mantener una respuesta Th1 prolongada. Se ha sugerido también que está involucrado en la generación de novo de células Th1. De igual modo IL-18 e IL-27 actuando junto IL-12 estimulan la diferenciación Th1 (Seder et al. 1993). Su función es claramente inflamatoria y desarrollan un papel clave en la activación de macrófagos y en promover la secreción de anticuerpos por parte de las células B. Una activación anormal de las células Th1 puede provocar enfermedades autoinmunes crónicas, como artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico, esclerosis múltiple o diabetes tipo 1 (Zhu et al. 2010).

1.2.2.1.2- Células Th2

Las células Th2 se relacionan con la inmunidad frente patógenos extracelulares mediada por la producción de citoquinas específicas como IL-4, IL-5, IL-10 y IL-13. Además, IL-4 es crítica en la propia generación de células Th2 cuyos factores de transcripción específicos son GATA-3 y STAT-6 (Broere et al.

2011). Las citoquinas secretadas por linfocitos Th2 son, en general, anti-inflamatorias y se relacionan con la producción de IgE por parte de las células B la activación de eosinófilos y las secreciones de las mucosas (Cohn et al. 1999).

1.2.2.1.3.- Células Th17

Las células Th17 se caracterizan por la producción de IL-17A, IL-17F, IL-21 y IL-22 además de expresar el factor de transcripción ROR γ t (Lee et al. 2009). Su origen se ha asociado con la respuesta a ciertos hongos y bacterias y en su generación juegan un papel clave las citoquinas IL-6, TGF- β e IL-23. Por su parte IL-17 es una potente citoquina pro-inflamatoria que amplifica la expresión del factor de necrosis tumoral (TNF)- α , y de las interleuquinas IL-1 β y IL-6 las cuales incrementarán la respuesta inflamatoria (Lochner et al. 2008). Las células Th17 son muy plásticas y de hecho la existencia de células Th17 de memoria es muy controvertida porque rápidamente se convierten en células productoras de IFN- γ tanto *in-vitro* como *in-vivo* (Lee et al. 2009), adquiriendo por lo tanto un fenotipo Th1 inflamatorio. De hecho, este fenotipo mixto se ha encontrado en algunas patologías como psoriasis, enfermedad de Crohn, esclerosis múltiple o artritis reumatoide (Broere et al. 2011; Zheng 2013; Shao et al. 2012). Por otro lado, una subpoblación de las células Th17 produce citoquinas anti-inflamatorias IL-22 e IL-10 que contrarrestan la respuesta Th17 (McGeachy et al. 2007).

1.2.2.1.4.- Células T reguladoras (Treg)

Las células reguladoras incluyen a

varios tipos celulares tales como CD4⁺, CD8⁺ y células B y son cruciales para el mantenimiento de la tolerancia periférica y la homeostasis inmune (Josefowicz et al. 2012). Sin embargo, las células Treg CD4⁺ son la subpoblación supresora que se encuentra en mayor cantidad en circulación. Una característica de este tipo celular es la expresión constitutiva de CD25, CTLA-4 y del factor de transcripción FoxP3; estas células producen además altos niveles de IL-19 y TGF- β (Horwitz et al. 2008). Las células Treg CD4⁺ se dividen en dos grupos: 1) **Treg naturales** que son células supresoras CD4⁺ derivadas del timo, que expresan CD25 y 2) células **Treg inducidas**, las cuales se inducen en los órganos linfoides periféricos desde células precursoras CD4⁺CD25⁻ (Aoki et al. 2005). Se ha establecido que mutaciones del gen Foxp3 están relacionadas con procesos inflamatorios, y por lo tanto con disregulación inmunológica, manifestándose como enteropatías, o síndromes ligados al cromosoma X (IPEX). Adicionalmente, la reducción del número o la actividad de las células Treg también se ha asociado a otras enfermedades autoinmunes tales como: EAE, esclerosis múltiple, artritis reumatoide y diabetes tipo 1 (Josefowicz et al. 2012).

1.2.2.1.5.- Células T cooperadoras foliculares

Las células T CD4⁺ que migran hacia los folículos para proveer ayuda a las células B son conocidas como células TFH, y expresan la quimiocina CXCR5, y moléculas coestimuladoras tales como ICOS, CD40L, y PD-1. Su función es ubicar las células B en el folículo. Las células TFH producen también varias citoquinas, IL-21, IL-4, IFN- γ y IL-17, y expresan el factor de transcripción Bcl-6 que regula su propio desarrollo (Liu et

al. 2012). Bcl-6 es un represor transcripcional, que al unirse al promotor de la región T-bet y ROR γ t suprime la diferenciación a Th1, y a Th17. Adicionalmente regula los niveles de GATA-3 suprimiendo la diferenciación a Th2 (Nurieva et al. 2009). Se ha caracterizado que el papel de las células TFH en el desarrollo de enfermedades autoinmunes, como en lupus eritematoso sistémico (SLE) en que los pacientes muestran niveles altos de células T ICOS⁺CD4⁺ en circulación y en bazo, está relacionado con la gravedad de la enfermedad (Kawamoto et al. 2006). Además se han identificado células TFH en tejidos no linfoides específicos en otras enfermedades, como el sinovio reumatoide en el caso de la artritis, en infiltrados pancreáticos en el caso de la diabetes tipo 1, o en las meninges inflamadas típicas de la esclerosis múltiple (King et al. 2008).

1.2.2.- Respuesta Humoral

El principal componente de la respuesta humoral adaptativa son los anticuerpos, o inmunoglobulinas. Los anticuerpos son glicoproteínas secretadas por plasmablastos (Mauri & Bosma 2012) y reconocen específicamente antígenos como bacterias, virus o parásitos. Ese marcaje permite después eliminar por mecanismos efectores de células fagocíticas. Sin embargo los anticuerpos también pueden activar directamente marcando y neutralizando epítomos presentes en los patógenos. Los anticuerpos están formados por 2 cadenas ligeras y 2 pesadas. En función de estas últimas se identifican distintos isotipos que además corresponden a propiedades diferentes e incluso se relacionan con funciones distintas, IgA, IgD, IgE, IgG e IgM (Abbas & Lichtman 2010).

2.- Tolerancia

Se define el concepto de tolerancia inmunológica como la falta de respuesta inmune frente un antígeno (propio o extraño). Puede tratarse de tolerancia natural, que permite al individuo no responder contra proteínas propias u otros antígenos, o inducida, cuando se manipula el sistema inmune para evitar respuestas contra antígenos externos. En general se trata de una respuesta activa sobre determinados epítopos y por lo tanto un proceso específico. Existe una tolerancia denominada central, que ocurre en el timo, y otra llamada periférica (Hogquist et al., 2005).

La tolerancia central se refiere a eventos tempranos que suceden tras los procesos de recombinación somática que generan los TCR presentes en las células T en el timo y permiten disponer de un patrón de reconocimiento de antígeno virtualmente ilimitado. Entre ese repertorio se incluye también la posibilidad de reconocimiento de epítopos de proteínas del propio organismo e incluso a las propias moléculas del MHC. Las células con estos TCR deben ser eliminadas y de hecho sufren apoptosis, en el proceso conocido como selección negativa (Hogquist et al. 2005; Chen et al. 2005).

Aun así, células T con capacidad de reconocer autoantígenos pueden salir a circulación. En periferia existe otro mecanismo denominado tolerancia periférica que consigue que células T maduras que reconocen antígenos propios en tejidos periféricos no sean capaces de responder al mismo y activarse (Xing & Hogquist 2012). Entre esos mecanismos destaca la ausencia de señales de coestimulación que deja a las células T auto-reactivas en

estado de anergia, las señales de muerte celular por apoptosis promovida por el ligando de Fas, el control por parte de células T reguladoras que suprimen la actividad de las células T y también deberían incluirse las propias barreras anatómicas que impiden a las células T llegar a determinados tejidos, los llamados sitios de privilegio inmunológico (el cerebro, el interior del ojo o los testículos) (Zouali, 2001).

3.- Autoinmunidad

La autoinmunidad resulta de la incapacidad de un organismo para reconocer como propias sus partes constituyentes lo que hace que se produzca una respuesta inmune contra sus propias células y tejidos. Se produce entonces una enfermedad autoinmune y al antígeno causante se le denomina autoantígeno. Existen enfermedades autoinmunes muy localizadas como la diabetes tipo 1, el síndrome de Crohn, artritis reumatoide, algunos tipos de alopecia, mientras otras son sistémicas, como es el caso del lupus eritematoso.

3.1.- Diabetes tipo 1

La diabetes tipo 1 (T1D) es una enfermedad autoinmune en la cual células inmunes auto-reactivas infiltran el páncreas y los islotes pancreáticos destruyendo las células productoras de insulina (Azar et al. 1999). La destrucción de las células β del páncreas provoca en el organismo un aumento de la glucosa circulante y a largo plazo puede originar lesiones vasculares, cardiopatías, retinopatías y enfermedades renales (Tang et al. 2008). Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), la T1D afecta aproximadamente a 1 de cada 300 niños, y probablemente a un número mayor de adultos. Desde 1920 se viene empleando

terapias de reemplazamiento de insulina como tratamiento de la diabetes. Este método ha estado en constante optimización hasta obtener hoy en día mecanismos de monitorización de la glucosa y liberación de la insulina de manera automática y paulatina, evitando así episodios de hipoglicemia por sobredosis de insulina (van Belle et al. 2011).

Como todas las patologías autoinmunes, la diabetes tipo 1 es una enfermedad compleja y multifactorial en cuyo desarrollo contribuyen factores ambientales y genéticos. Existen polimorfismos génicos asociados a una susceptibilidad de padecer diabetes tipo 1 en más de 20 loci cromosómicos. La mayoría de dichos polimorfismos se asocian al MHC de clase II (en humanos conocido también como antígeno leucocitario humano ó HLA de clase II). La asociación más fuerte entre la T1D y el MHC-II es el locus diabetes mellitus insulina-dependiente, IDDM1 en seres humanos e idd1 en ratones. Estudios sobre distintas poblaciones han indicado que las variantes alélicas de los parálogos-DRB1, -DQA1 y -DQB1 de la HLA de clase II son las que presentan mayor asociación en humano (Cucca et al. 2001). La susceptibilidad genética es necesaria para iniciar la enfermedad, pero no se considera suficiente para su desarrollo, por lo que otros factores como por ejemplo agentes patógenos y/o ambientales afectan la incidencia de la T1D y a su progresión (Lehuen et al. 2010).

Aunque el desarrollo de la enfermedad se ha asociado al reclutamiento de distintas poblaciones celulares CD4⁺, CD8⁺, células dendríticas, macrófagos, NK, células B al islote pancreático (Cucca et al. 2001), se especula que el inicio de la enfermedad venga definido

por la existencia de células T auto-reactivas que normalmente debieran ser eliminadas durante el proceso de tolerancia central y que sin embargo escapan del timo. Las células auto-reactivas deben ser en todo caso, activadas por el autoantígeno, proceso en el que participan las células presentadoras o APC's (Lennon et al. 2009) y seguramente serán los macrófagos los que primero contribuyen a la creación de un ambiente inmune apropiado para el desarrollo y activación de las células T citotóxicas que destruirán a las células pancreáticas (**fig. 2**) (Jun et al. 1999).

Histopatológicamente, la enfermedad se desarrolla en fases claramente diferenciadas. Las primeras células en acumularse en torno a los islotes son macrófagos y células dendríticas, seguidas por linfocitos, generando así una fase de inflamación denominada “periinsulitis”, sin efectos aparentes sobre la integridad y actividad de las células productoras de insulina. Eventualmente, esta situación progresa hacia una fase de insulitis invasiva, con la destrucción de la capa de células de Schwann que envuelve el islote y la infiltración del parénquima insular, fase asociada con la destrucción de células β y con la consiguiente insulinemia e hiperglucemia (Calderón et al. 2006).

3.2.- Inmunoterapia

Aparte del tratamiento con insulina, se han probado experimentalmente y en ensayos clínicos algunas estrategias de inmunoterapia para prevenir o suprimir la diabetes tipo 1. Estas inmunoterapias se han clasificado en antígeno-independiente y antígeno-dependiente. **Las antígeno-independientes** son estrategias que tienen como diana tanto las células T autoreactivas como las no autoreactivas. El

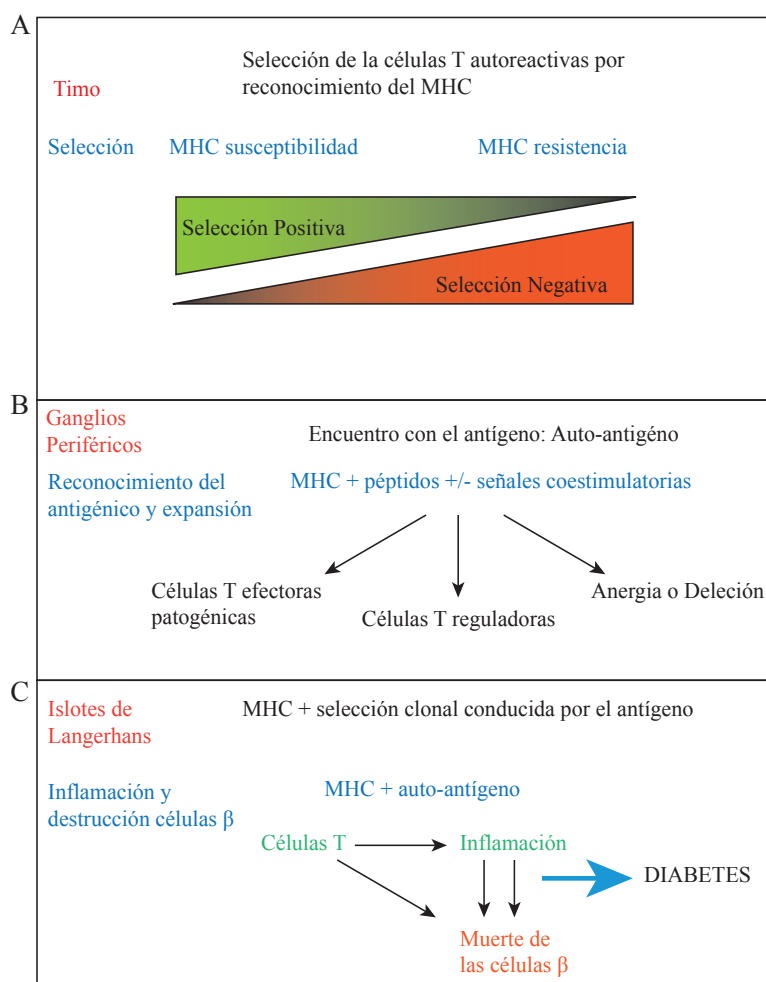


Figura 2. Desarrollo del diabetes tipo 1 por defecto en la presentación antigénica. A) Distintos haplotipos del MHC-II influyen en la susceptibilidad a la diabetes tipo 1 afectando a la selección positiva o negativa de células T reactivas con el islote. B) Células APC que han reconocido un antígeno de islote migran hacia los ganglios periféricos, en donde se encontrarán con células autoreactivas. La presentación antigénica que sucede aquí dará a lugar células efectoras patológicas, falta de supresión por parte de las células Treg, o anergia. C) En la fase efectora, las células $CD4^+$ y $CD8^+$ T contribuyen a la pérdida de células y insulinitis. De células T $CD8^+$ destruyen las células de una manera dependiente de perforinas, mientras que las células $CD4^+$ T pueden matar a las células por la secreción de citoquinas como el $TNF-\alpha$. La presentación de los antígenos del islote se realiza por el aumento de la regulación del MHC de clase II y el antígeno presentado por una APC, que conduce a la activación de células T específicas hacia el auto-antígeno. Finalmente la diabetes se produce cuando la mayoría de las células β productoras de insulina se ha destruido.

empleo de ciclosporina tuvo efectos positivos en la remisión de la enfermedad, sin embargo producía demasiados efectos secundarios y a largo plazo permitía la reaparición de células T autoreactivas (Stiller et al. 1987). En todo caso esta estrategia demostró que considerar a las células T autoreactivas como dianas puede ser efectivo como tratamiento potencial de la

patología (van Belle et al. 2011). También se emplearon citoquinas como IL-10, IL-4, IL-13 ó $TGF-\beta$ pero sus efectos son variables durante la progresión de la enfermedad (Van Belle et al. 2011). Además, estudios empleando la GH como una terapia de sustitución en pacientes con T1D y panhipopituitarismo (déficit total de hormonas hipofisarias) han demostrado a corto

plazo efectos beneficiosos tales como reducción de ataques hipoglucémicos, y mejora de calidad de vida del paciente (Christ et al. 2003). Las terapias **antígeno-dependientes** utilizan auto-antígenos que mitigen la presencia o actividad de las células T auto-reactivas. Por ejemplo se ha empleado la vacunación con autoantígenos para promover la inducción y expansión de células T reguladoras que supriman a las células efectoras patogénicas específicas del antígeno. Estudios preclínicos que usan el antígeno GAD65 en dosis bajas, han demostrado reducción o retraso de la diabetes tipo 1 (Agardh et al. 2005).

4.- Neuroendocrinología

El control neuroendocrino en el organismo está involucrado en distintos procesos del desarrollo, tales como crecimiento, metabolismo y reparación de tejidos, pero también modula la actividad del sistema inmunológico (Inmunoneuroendocrinología). Algunas hormonas neuroendocrinas como la hormona de crecimiento (GH), la prolactina (Prl) o el lactógeno placentario (PL), ejercen funciones pleiotrópicas en el sistema inmune (Savino & Dardenne 2000). Se ha descrito la GH aumenta la proliferación de distintos tipos celulares en el timo y estimula la secreción de hormonas tímicas, citoquinas y quimioquinas que facilitan la migración de células T a zonas periféricas. (Savino et al., 2012).

4.1.- GH-Efectos sobre el sistema inmune

La hormona de crecimiento (monómero de 22-25 kDa) ha demostrado ser un modulador en la actividad fisiológica del timo repercutiendo directamente en la actividad del

sistema inmunológico, como se evidencia en ratones deficientes para GH donde se ha visto un déficit de células inmunes en timo y en circulación periférica (Savino, Smaniotto, Mendesda-Cruz, & Dardenne, 2012). En estudios *in-vitro* la GH aumenta la proliferación de células T, o la producción de citoquinas liberadas por monocitos (Postel-Vinay et al. 1997).

La GH es producida en la adenohipófisis por células especializadas llamadas células somatotróficas. Su producción sigue pautas circadianas y aumenta en horas nocturnas, presentando pautas dependientes de género, más discontinuas y regulares en los machos, y más bajas, continuas e irregulares en las hembras. Además, la secreción en picos de sierra se frena durante el embarazo cuando la GH es sustituida por una variante placentaria. Los órganos que presentan un mayor número de receptores de la hormona de crecimiento (GHR) son el hígado y el tejido adiposo (L. A. Welniak, Sun, & Murphy, 2002). Gran parte de la actividad de esta hormona está relacionada con el incremento de la síntesis de amino ácidos dentro de las células, el incremento de la síntesis de proteínas y la lipólisis (**fig. 3**) (Welniak et al. 2002).

La GH estimula la producción de su principal mediador, el factor de crecimiento insulina tipo I (IGF-1), muy similar en estructura molecular a la insulina. Aunque IGF-I se expresa principalmente en el hígado, su producción es muy ubicua, incluso se ha descrito su producción por células del sistema inmune como, por ejemplo, los macrófagos (Welniak et al. 2002).

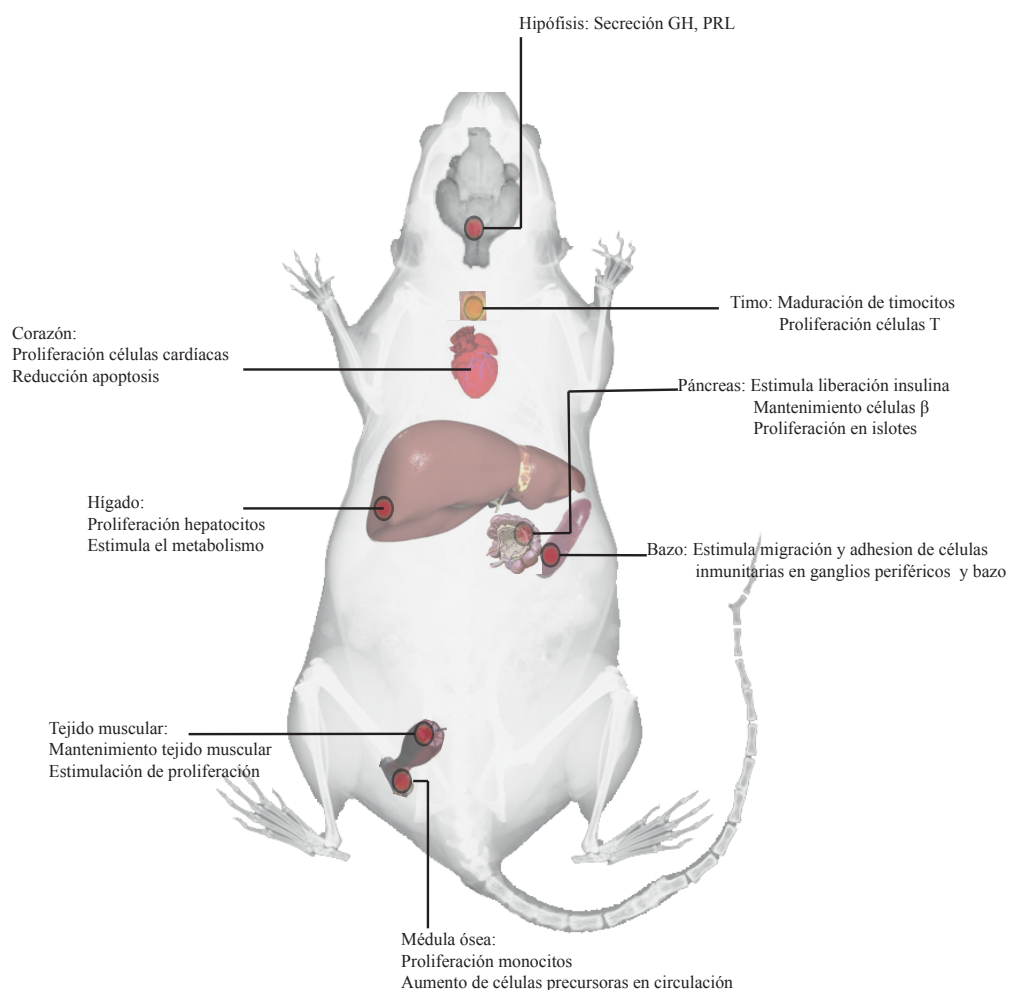


Figura 3.- Esquema del efecto de la hormona de crecimiento sobre distintos órganos en el ratón. Mayoritariamente los efectos de la GH son sobre la estimulación de la proliferación y el metabolismo celular (Welniak, 2002), así como en ganglios y bazo influye en la migración y adhesión de las células T y B (Taub, 1994). Además se le ha implicado como estimulador de la salida de precursores celulares a la circulación (Savino et al., 2007).

4.1.2.- Regulación de GH

La actividad que tiene la GH está asociada a una serie de genes involucrados en el crecimiento somático, y funciones metabólicas de las células. También existen mecanismos indirectos que modulan su actividad relacionados con las señales de transducción y activación de la ruta JAK/STAT. La GH ejerce su función tras unirse a su receptor (GHR) en la superficie celular lo que provoca su dimerización y activación de la tirosina quinasa JAK2 por transfosforilación

y el reclutamiento del factor de transcripción STAT5 (Lee et al. 2007). La fosforilación del dímero de STAT5 y su translocación al núcleo provoca los efectos de la GH sobre la expresión génica, el ciclo celular, la modulación de secreción de proteínas, o la supervivencia celular (Jensen et al. 2005). En el caso de las células β , la activación de STAT5 estimula la expresión de genes para los receptores GHR, ciclinas, e insulina (Brelje et al. 2004).

5.- Modelo de ratón transgénico para hormona de crecimiento

Palmiter y Brinter fueron los primeros en describir en 1982 un ratón transgénico para la hormona de crecimiento, cuando fusionaron un promotor de metalotioneína I al gen de la GH de rata (Mcgrane et al. 1990). Hoy en día existen transgénicos de GH de distintas especies, GH humana (hGH), ovina (oGH), bovina (bGH) (Kopchick et al. 1999). Para este proyecto hemos empleado el ratón que sobreexpresa bGH, bajo el control del promotor de la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (PEPCK). El ratón es viable, alcanza gran tamaño (dos veces un ratón normal), presenta artrosis en edad avanzada, y se ha observado deterioro en la vida media reproductiva con esterilidad en una proporción variable de los animales (Esquifino et al. 2002).

6.- Páncreas y células β productoras de insulina

El páncreas es un órgano glandular con funciones endocrinas y exocrinas. Como glándula exocrina secreta enzimas digestivas que facilitan la absorción de proteínas y lípidos. Por otro lado, su función endocrina es la secreción de hormonas como la insulina y glucagón a la sangre. Las células responsables de la función exocrina son epiteliales y se organizan en ácinos pancreáticos. La función endocrina se asocia a células especializadas agrupadas en los llamados islotes de Langerhans (Jørgensen et al. 2007), que son realmente cúmulos de cuatro tipos celulares principales (**fig 4 A**):

1.- **Células α** encargadas de producir y secretar glucagón, hormona hipoglucemiante que aumenta los niveles de glucosa en la sangre a partir de glucógeno hepático.

2.- **Células β** que producen la insulina, su función es de reducir los niveles de glucosa en la sangre facilitando su uso en las células y su almacenamiento como glucógeno.

3.- **Células δ** que producen somatostatina, hormona inhibidora de la síntesis de GH y que interviene indirectamente en la regulación de la glucemia, inhibiendo la secreción de insulina y glucagón.

4.- **Células γ** que secretan un polipéptido pancreático que autorregula la función secretora (endocrina y exocrina del páncreas).

6.1.- Condiciones fisiológicas del páncreas endocrino

El páncreas endocrino se desarrolla en humanos a partir de la quinta semana de gestación pero su formación culmina con su remodelación en el momento de abandonar la dieta estrictamente láctea, proceso en el que tienen una función importante los macrófagos. De todos modos el páncreas endocrino no pierde completamente su capacidad de generación de nuevos islotes durante la edad adulta (Szabat et al. 2012). Entre los factores que inician estos mecanismos de renovación de las células β están la hormona de crecimiento (GH), la prolactina (Prl) y el lactógeno placentario (PL) (Yesil et al., 2008). Los mecanismos de regeneración de los islotes son desconocidos, pero se han propuesto varias hipótesis basadas todas en la existencia de progenitores de células β , que se expanden

por auto-duplicación y diferencian hacia células productoras de insulina (Soundarapandian et al. 2010):

1.- **Neogénesis** a partir de precursores del epitelio ductal del páncreas que expresan hormonas de islote como la insulina, estos precursores se localizan cerca de las ramificaciones de los ductos. Es la hipótesis más aceptada de origen de las células β durante los estadios fetales (Paris et al. 2004).

2.- **Transdiferenciación** de células de origen de tejido exocrino del páncreas o de hepatocitos que pueden cambiar su fenotipo hacia células productoras de insulina. El mecanismo no está bien definido y ni siquiera hay marcadores claros. Se ha observado que expresan el factor de transcripción Ngn3 que normalmente estaba activo durante la embriogénesis (Bouwens & Rookman 2005).

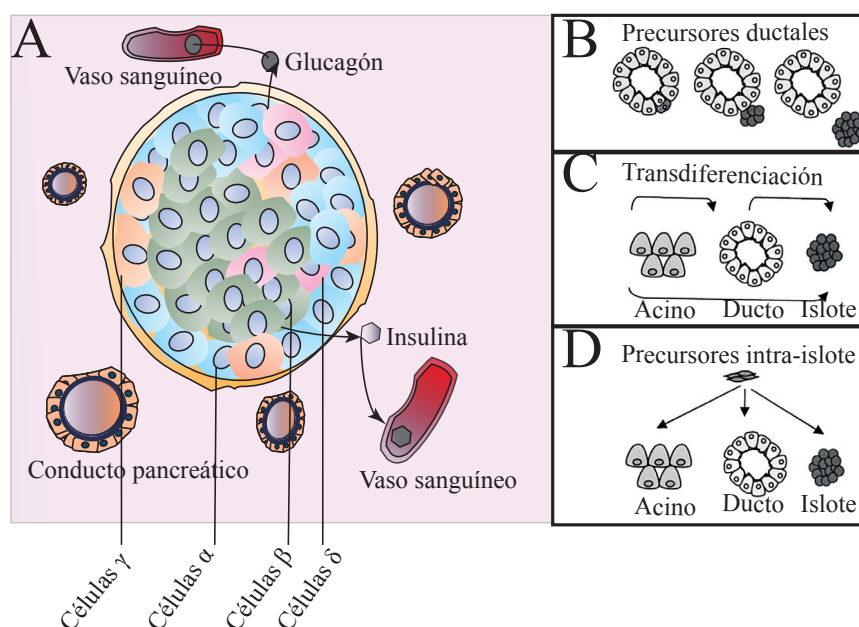


Figura 4.- A) Ilustración de un islote pancreático, con los subtipos celulares que lo integran. Las células α componen el 10% del islote, y secretan glucagón. Las células β conforman el 80% del islote, secretan insulina. Las células δ secretan somatostatina. Las células γ producen polipéptido pancreático, estas dos últimas células conforman el restante 10% del islote. Además, en los ductos pancreáticos se pueden encontrar 1 precursora según el origen de las células endocrinas del páncreas. B) Neogénesis de precursores ductales que expresan Ngn 3 y posteriormente, PDX-1; C) Transdiferenciación de células de acino por expresión de tres genes (PDX-1, Ngn3 y MafA), o de células α , por expresión de Pax4. D) Precursores intra-islote que pueden diferenciarse en distintas células pancreáticas, expresan PDX-1 y somatostatina. (Paris et.al. 2004)

3.- **Precursores** intra-islole son células capaces de diferenciarse en células β productoras de insulina. Se distinguen por expresar somatostatina y el factor de transcripción PDX-1 (pancreatic duodenal homebox-1); además pueden tener un origen mesenquimal (Trucco 2005).

Estos mecanismos propuestos anteriormente se asocian a la formación de tejido endocrino y a la capacidad en producir insulina (**fig. 4 B-D**) (Rooman et al. 2000).

7.- Modelo de ratón NOD

Para el estudio de la diabetes tipo 1 se han desarrollado varios modelos; uno de los cuales es el ratón NOD (non-obese diabetic). La incidencia de la diabetes espontánea del ratón NOD es del 60% al 80% en las hembras y <25% en los machos para ratones mayores de 30 semanas (Melanitou 2005). Esta diferencia en la incidencia de la enfermedad se ha atribuido a la presencia de hormonas sexuales (Melanitou. 2005). Sin embargo el desarrollo de la enfermedad una vez establecida es similar en los dos sexos (Young et al. 2010). La diabetes tipo 1 del ratón NOD es muy similar a la patología humana (Aoki et al. 2005). Estudios histológicos del páncreas han proporcionado información sobre la destrucción de las células β en los islotes pancreáticos, en donde se observan células infiltrantes a lo largo del tiempo, empezando con una cantidad de células mononucleares alrededor del islote pancreático (peri-insulitis), que progresa e invade el islote (insulitis) (Anderson & Bluestone. 2005). Los infiltrados pancreáticos son en su mayoría células $CD4^+$, $CD8^+$, B, y NK (Faveeuw et al. 1995; Young et al. 2010).

Los estudios genéticos sobre el origen de la enfermedad han determinado loci genéticos en el ratón NOD (MHC-II y CTLA-4) homólogos a los del ser humano (Aoki et al. 2005). El haplotipo $IA\beta^{g7}$ del MHC-II del ratón NOD (equivalente al DQ- β en humanos) contribuye a las disfunciones en la presentación de los auto-antígenos a los timocitos maduros y, como resultado, a un defecto en la selección negativa y en la tolerancia central (Kishimoto & Sprent 2001; Crawford et al. 2011). CTLA-4 es otra de las moléculas implicadas en la desregulación en el ratón NOD. CTLA-4 inhibe la proliferación de las T inducida tras la coestimulación, siendo tanto la inhibición como la coestimulación más débiles en el ratón NOD (Aoki et al. 2005). Se ha descrito en los ratones NOD una falta de supresión por parte de las células T reguladoras, es decir, una clara deficiencia en los mecanismo de tolerancia periférica. En ratones NOD pre-diabéticos hay una menor cantidad de células Treg $CD4^+CD25^+$ y también se reduce su capacidad de suprimir a células $CD4^+CD25^-$ auto-reactivas (Buckner 2010; Ferreira et al. 2009). Otras alteraciones descritas en la respuesta inmunitaria del ratón NOD son la resistencia a la inducción de la apoptosis en células T (Arreaza et al. 2003), la maduración y activación defectuosa de los macrófagos, y una actividad baja de células NK (Anderson & Bluestone 2005). En cuanto a las población Th17 en el ratón NOD, se sabe que contribuye a la respuesta inflamatoria característica. Los niveles altos de IL-17 que se encuentran alrededor de las lesiones de los infiltrados pancreático, y los niveles altos que aparecen en suero han sido asociados al desarrollo de la diabetes (Ferraro et al. 2011). De hecho la reducción de las células Th17 protege al ratón NOD de la enfermedad (Emamaullee et al. 2009) (**fig.5**).

El modelo NOD también ha permitido estudios sobre los antígenos que conducen la respuesta diabetogénica. Algunos de los auto-antígenos responsables son propios de las células β , como la glutamato descarboxilasa (GAD) o la insulina. En el caso de la insulina, que es una molécula abundante y expresada por las células β , es una diana para las células T patogénicas en el ratón NOD (Mohan et al. 2010). En especial, células T $CD4^+$ aisladas

de infiltrados pancreáticos de ratones NOD muestran una alta reactividad hacia la insulina (Anderson & Bluestone 2005; Nakayama et al. 2005). Hoy sabemos también que GAD está relacionado con la respuesta de las células β a la glucosa. Uno de los isotipos de la GAD, la GAD65, está involucrada en la patogénesis y su detección temprana en circulación es una prueba muy específica de pacientes pre-diabéticos (Anderson & Bluestone et al. 2005).

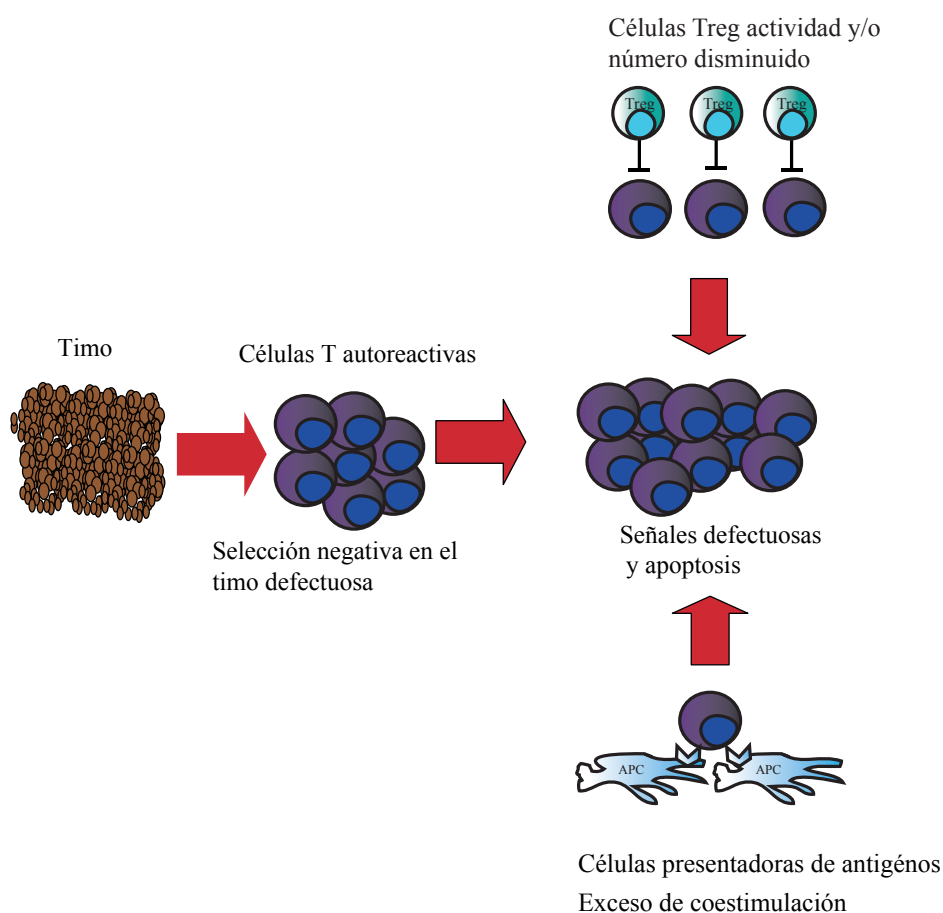


Figura. 5.- Patofisiología autoinmune en el ratón NOD (Aoki, 2005). Células T autoreactivas que escaparon de la selección negativa en el timo salen a circulación y junto con señales defectuosas en la presentación antigénica, y una deficiencia en la función y actividad de células Treg, ocurre la T1D, al reconocer las células T autoreactivas un antígeno del islote pancreático y su posterior destrucción.

OBJETIVOS

Aunque las evidencias apoyan una relación estrecha entre los sistemas neuroendocrino e inmunológico, y datos obtenidos de ratones que sobre expresan o son deficientes en hormona de crecimiento indican como esta hormona afecta a la proliferación de las células T y B, a la síntesis de inmunoglobulinas y a la maduración de progenitores mieloides, poco o nada se conoce sobre los efectos de GH en el desarrollo de las patologías autoinmunes.

1. Analizar los efectos del sistema endocrino sobre la autoinmunidad, en concreto el papel de la hormona de crecimiento en el desarrollo de la diabetes tipo 1 o autoinmune y en su caso determinar el mecanismo molecular y celular implicado con especial atención a su efecto sobre:
 - a. Los islotes pancreáticos.
 - b. Las células del sistema inmunológico.

MATERIALES Y MÉTODOS

1.-Materiales y Métodos

1.1.- Ratones

Todos los procedimientos fueron aprobados por el Comité Ético de Experimentación Animal, Centro Nacional de Biotecnología-CSIC.

En todos los experimentos se utilizaron como controles hembras vírgenes NOD/LtJ y C57BL/6J de colonias mantenidas en nuestro animalario.

Los ratones recibieron una dieta estandarizada (Global Diet 2918, Harlan Ibérica; proteína 18.5 %, aceites 5.5 % y grasas), y agua *ad libitum*.

1.1.1.- Diseño del ratón transgénico NOD-bGH

El ratón transgénico para la hormona del crecimiento bovina bajo el control del promotor fosfoenolpiruvato carboxiquinasa de rata (híbrido con fondo C57BL/6J x C3H/J) fue

cruzado con hembras NOD, continuando con retrocruces sucesivos hasta la estabilización de alelos polimórficos (F0; NOD-Tg PEPCK-bGH/Cmar), valorados por la longitud de secuencias repetitivas. La línea se mantuvo con cruces de machos transgénicos con hembras NOD.

2.- Diagnóstico de la diabetes

Los valores de glucosa en sangre se determinaron quincenalmente empleando el Kit Accutrend (Roche Diagnostics), y la diabetes fue diagnosticada cuando dos mediciones sucesivas superaron los 200 mg/dl. Por razones éticas, los ratones diabéticos fueron sacrificados por inhalación de CO₂.

3.- Anticuerpos y Oligonucleótidos

Los anticuerpos y oligos utilizados en este proyecto se relacionan en las **tablas 1-3**.

Anticuerpos Primarios

Anticuerpo (anti-)	Conjugado	Origen	Técnica	Casa Comercial
CD3	FITC	Hamster	FACS	Beckman C
CD4	SPRD	Rata	FACS / IH	BioLegend
CD8	FITC	Rata	FACS / IH	Beckman C
CD11b	FITC	Rata	FACS / IH	Pharmingen
FoxP3	PE	Rata	FACS	BioLegend
CD25	PE	Rata	FACS	Pharmingen
CD44	PE	Rata	FACS	Beckman C
CD45	FITC	Rata	FACS	Beckman C
CD62-L	PE	Rata	FACS	Southern
CD86	PE	Rata	FACS	BioLegend
B220	APC/PE	Rata	FACS / IH	Beckman C
Gr-1	PerpCp.Cy5.5	Rata	FACS	Pharmingen
CD69	FITC/PE	Hamster	FACS	Pharmingen
F4/80	Biotina	Rata	IH	Pharmingen
Ki-67	Biotina	Conejo	IF	NovoCastr
PDX-1	Biotina	Conejo	IF	Abcam
Insulina	HRP	Cobaya	IF / IH	Novo-Nordisk
Laminina	HRP	Conejo	IH	Dako
IgG	HRP	Cabra	ELISA	Dako
IgM	HRP	Cabra	ELISA / activación	Dako
Kappa	HRP	Cabra	ELISA	Dako
fosfo-Stat3	Purificado	Conejo	Western Blot	Cell Signalling
fosfo-Stat5	Purificado	Conejo	Western Blot	Cell Signalling

Tabla 1.- Relación Ab primarios para distintas técnicas empleadas durante la experimentación.**Anticuerpo secundario**

Anticuerpo (anti-)	Conjugado	Origen	Técnica	Casa Comercial
Ratón-HRP	HRP	cabra	ELISA / IF	Jackson
Conejo-HRP	HRP	cabra	IF	Jackson
IgG conejo	Cy3	cabra	IF	Jackson
IgG rata	Cy5	ratón	IF	Jackson
Cabra	Cy3	burro	IF	Jackson
Estreptavidina	HRP	-	IF	Amersham

Tabla 2.- Relación Ab secundarios para distintas técnicas empleadas durante la experimentación.

	Gen	Referencia		Secuencia
RT-PCR	NOS2	NM010927.3	2199-2270	5'GGCAGCCTGTGAGACCTTTG3'
				5'GCATTGGAAGTGAAGCGTTTC3'
	ARG1	NM007482.3	80-270	5'AGCCGCTGGAACCCAGAGAGA3'
				5'AACAAAGGCCAGGTCCCCGTG3'
	TBX21	NM009322	474-574	5'CACTAAGCAAGGACGGCGAA3'
				5'CCACCAAGACCACATCCACA3'
	RORC	NM011281	651-683	5'GCCTCCTGCCACCTTGAGT3'
				5'TCTGCCTTCAGCTTTCCTC3'
	IFNG	K00083	929-1029	5'TGCTGATGGGAGGAGATGTCT3'
				5'TTTCCTTCAGGGACAGCCTGTT3'
	IL10	NM010548	113-218	5'TGACTGGCATGAGGATCAGC3'
				5'AGTCCGCAGCTCTAGGAGCA3'
	IL17A	NM010552	338-398	5'GAAGCTCAGTGCCGCCA3'
				5'TTCATGTGGTGGTCCAGCTTT3'
	IL2	NM008366	252-352	5'GAAACTCCCCAGGATGCTCA3'
				5'GCCGCAGAGGTCCAAGTTC3'
	IL22	NM016971	204-271	5'TACATCGTCAACGCACCTTT3'
				5'CGGACGTCTGTGTTGTTAT3'
	CSF2	NM009969.4	664-684	5'AGATATTCGAGCAGGGTCTAC3'
				5'GAGTTGTCATATTTCTCGTGG3'
	ACTINA	NM007393	694-831	5'AGAGGGAAATCGTGCGTGAC3'
				5'CAATAGTGATGACCTGGCCGT3'

Tabla 3.- Relación oligonucleótidos utilizados para la RT-PCR

4.- Inmunohistoquímica

4.1 Procesado del tejido en criostato

Los páncreas se incluyeron en criomoldes (Tissue-Tek®), con medio O.C.T. (Tissue-Tek®) y se congelaron por inmersión durante 2 minutos en 2-metilbutano (Merck) pre-enfriado en nieve carbónica. Las muestras congeladas se almacenaron a -80°C. Para el proceso de corte los tejidos fueron equilibradas previamente -18°C en la cámara del criostato y con una temperatura de -20°C en el cabezal portamuestras. Las secciones, de 5 o 7 µm de grosor, se recogieron en portaobjetos Super-Frost Ultra Plus (Thermo Scientific). Los criocortes se secaron 2-3 horas, TA, se fijaron con acetona (10 minutos, -20°C) y se guardaron a -80°C.

4.2.- Tinción inmunohistoquímica.

Las criosecciones se atemperaron a temperatura ambiente (TA) durante 10 minutos; se lavaron dos veces con TBST para hidratar las muestras (TA, 5 minutos). La biotina endógena se bloqueó mediante incubación (10 + 10 minutos) con Avidin/Biotin Blocking Kit (Vector) y la adsorción inespecífica con TNB (Perkin Elmer) durante 1 hora; las incubaciones con los anticuerpos primarios, diluidos en TNB, se realizaron durante 90 minutos a TA, en cámara húmeda. Tras tres lavados de 5 minutos

en TBST, se realizó la incubación con los anticuerpos secundarios en TNB (45 minutos, TA), seguida de tres lavados en TBST. La inmunodetección se realizó con el kit comercial de amplificación de señal TSA indirect staining kit (Perkin Elmer) y visualización con diaminobenzidina (DAB, Sigma), según protocolo del fabricante (incubación con tiramida biotinilada e incubación subsiguiente con Estreptavidina-peroxidasa (HRP) antes del revelado con DAB). Finalmente, se realizó una contra-tinción con hematoxilina durante 5 minutos, y una serie de cuatro lavados en agua de 3 minutos cada uno para eliminar el exceso de hematoxilina. Las secciones fueron deshidratadas en concentraciones crecientes de etanol, clarificadas en Xylene substitute (Sigma) y montadas con Vecta Mount (Vector) y cubre-objetos (24 x 50 mm, Menzel-Glaser). Para visualizar las tinciones se empleó un microscopio (Leitz) de campo claro, a 6,3X, 10X, 20X, 40X y 63X (en aceite de inmersión). Las imágenes fueron procesadas con ayuda del programa Adobe Photoshop CS5.

Para las inmunofluorescencias se siguió el mismo procedimiento hasta la incubación con los anticuerpos primarios, que se realizó durante 12-16 horas a 4°C. La incubación con los anticuerpos secundarios fluorescentes se realizó durante 45 minutos, a TA, en la oscuridad, así como los subsiguientes lavados. Para la contratinción de núcleos y el montaje

se utilizó Vecta Shield con DAPI (Vector). Las preparaciones se conservaron a 4°C en la oscuridad.

4.3.- Determinación de la masa de células β y niveles de infiltración

Se extrajeron páncreas completos que fueron pesados, fijados en PBS-formaldehído 4% e incluidos en parafina. Para estimar la masa total de células de islote, se analizó una cada 20 secciones de 5 μm obtenidas sucesivamente. Las secciones fueron teñidas con hematoxilina/eosina (H&E) y fotografiadas con una lupa binocular Leica con una amplificación de 10X. Las imágenes compuestas fueron generadas con la función Photomerge de Adobe Photoshop CS5; el mismo programa se utilizó como herramienta de recuento en el siguiente procedimiento. Sobre las imágenes se superpuso una cuadrícula con

líneas espaciadas el equivalente a 50 μm . Se contaron las intersecciones coincidentes con páncreas endocrino y las intersecciones totales en tejido pancreático. La masa de células β se calculó como la fracción de tejido endocrino frente al total, multiplicado por el peso del páncreas (v. fórmula) (Sato & Herman, 1981).

$$Mi = Mp \frac{Ni}{Np}$$

Mi: masa de los islotes

Mp: masa total del páncreas

Ni: número de intersecciones coincidentes con páncreas endocrino

Np: número de intersecciones coincidentes con tejido pancreático (endocrino + exocrino)

Para determinar la infiltración de los islotes se emplearon las secciones de cortes anteriores y se observaron por microscopio a 20X. Para catalogar los infiltrados empleamos el siguiente criterio: Insulitis severa (grado 3,

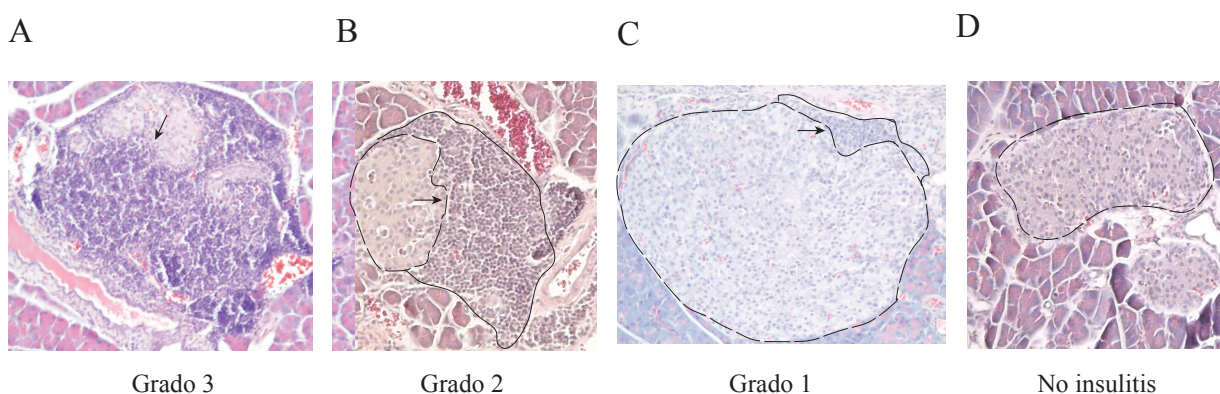


Figura 6 .- Criterio empleado para la catalogación de la insulitis

fig. 6 A), 50% o más del islote muestra una infiltración; insulitis grave (grado 2, **fig. 6 B)**, <50% o más del islote muestra infiltración; insulitis leve, se restringe a infiltrados mononucleares en la periferia del islote (grado 1, **fig. 6 C)**, y no insulitis (grado 0, **fig. 6 D)**, ausencia de infiltración.

5.- Ensayo de Hipersensibilidad Retrasada

Se aislaron esplenocitos de ratón C57BL/6 por disgregación mecánica, y se lisaron los eritrocitos con cloruro amónico (7.5 g/L NH_4Cl y 2.06 g/L Tris HCl a pH final de 7,2 durante 5 minutos) y se realizaron varios lavados primero con PBS + 0.1% BSA y luego con PBS. Ratones de fondo genético NOD, de seis semanas de edad, fueron sensibilizados por inyección i.v. de 2×10^5 esplenocitos de ratón C57BL/6 en 200 μL de PBS. A los seis días fueron re expuestos al antígeno mediante la inyección en la almohadilla plantar derecha de 1.5×10^7 células en 50 μL de PBS. Como control, la almohadilla izquierda recibió 50 μL de PBS. El grado de inflamación se determinó con un calibre vernier (Mitutoyo) a 24, 48 y 72 horas después de la re exposición. Los resultados fueron expresados como porcentaje de la medida a los distintos tiempos tras la re exposición respecto de la realizada a tiempo 0. El análisis estadístico se realizó mediante una prueba t Student.

6.- Cuantificación de anticuerpos y citoquinas

6.1.- Ensayo de Inmunoabsorción Ligado a Enzima (ELISA)

Para la determinación de la presencia de auto-anticuerpos, la sangre extraída de los ratones se dejó coagular 3-4 horas a TA. El suero se purificó por 2-3 centrifugaciones a 12000 rpm durante 10 minutos c/u, se recogió en tubos Eppendorff y se congeló a -80°C . La respuesta humoral autoreactiva se valoró por la presencia de anticuerpos anti-insulina mediante un ELISA específico. Para ello se tapizaron placas de 96 pocillos con insulina humana (Novo-Nordisk) a 20 $\mu\text{g/mL}$ en PBS (16 horas, 4°C , 100 μL / pocillo). Las placas se postapizaron con BSA 1%, 0,01% Tween20 en PBS (1 h, 25°C). Después de lavar 3 veces con PBS, se agregaron diluciones seriadas de los sueros, se incubaron 2 horas a TA y se lavaron tres veces con PBS antes de añadir el anticuerpo secundario, un conjugado $\alpha\text{-Ig}$ total de ratón-HRP (45 min, RT; Dako, 1:2000). Tras nuevos lavados, se agregó o-fenilendiamina (OPD) (20 minutos, 25°C , en oscuridad; Sigma) y la reacción se termino añadiendo 50 μL H_2SO_4 (3 M). La cantidad de producto de la reacción se determinó por absorbancia a 490 nm en un espectrofotómetro para placas Sunrise.

Para determinar el nivel de respuesta a antígenos exógenos, se probaron sueros de

ratones inmunizados con ovoalbúmina (OVA). En este caso las placas de ELISA se tapizaron con OVA (Sigma) a 2 mg/ml en PBS. La detección se realizó con conjugados anti-IgG de ratón (Santa Cruz, 1/2000) o anti-IgM de ratón (Dako, 1/2000). Los niveles totales de inmunoglobulinas en sangre se determinaron probando los sueros en placas tapizadas con anticuerpos contra la cadena kappa de la inmunoglobulina de ratón (Dako, 1/50 en PBS).

6.2.- Cuantificación de citoquinas

Los sueros procesados como en el apartado anterior (7.1) se mantuvieron a -80°C hasta su utilización. Las citoquinas circulantes se cuantificaron con el kit Bio-Plex Pro® (Bio-Rad) en un lector Bio-Plex® 200 según instrucciones del fabricante. Las muestras de suero diluido 1/4 se analizaron por duplicado. Los resultados se analizaron con un test ANOVA en Prism; $p < 0,05$ se consideró significativa.

7.- Transfer adoptivo

Se aislaron esplenocitos por disgregación mecánica del bazo, tamizado por malla de 40µm (BD Falcon) y los eritrocitos se lisaron en 3 mL de NH_4Cl durante 5 minutos. Un total de 2×10^7 células en 200 µL de PBS se inyectaron i.v. en la cola del ratón recipiente. Según los casos, los ratones receptores fueron

previamente irradiados letal (12 Gy) o subletalmente (7 Gy) con una fuente ^{137}Cs . Las curvas de supervivencia de Kaplan Meier se compararon con una prueba Log-rank, considerándose significativas las diferencias con $p < 0,05$.

8.- Análisis de apoptosis en islotes de Langerhans

Ratones normoglucémicos (glucosa < 120 mg/ dL) de 14 semanas de edad fueron sacrificados, se extrajo su páncreas y se embebió en parafina para posteriores análisis. La cuantificación de células apoptóticas se realizó sobre cortes en parafina de 5 µm de grosor teñidos con H&E. Las células apoptóticas se identificaron según criterios morfológicos (Elmore, 2007), visualizados por microscopía a un aumento de 63X.

9.- Purificación de células T

Los esplenocitos se resuspendieron en medio RPMI 1640 (Lonza) suplementado con 10% suero fetal bovino, 2 mM L-glutamina, y 40 mg/mL penicilina/estreptomicina. Las poblaciones celulares $\text{CD4}^+\text{CD25}^+$ y $\text{CD4}^+\text{CD25}^-$ fueron purificadas por Dynabeads FlowComp Mouse $\text{CD4}^+\text{CD25}^+$ Treg Cells Kit (Invitrogen), según las instrucciones del fabricante. El análisis de pureza demostró un valor $> 90\%$ tras análisis por citometría de flujo con anticuerpos específicos.

9.1.- Purificación de linfocitos B

Los esplenocitos se centrifugaron en gradiente de densidad, Lympholyte® (1, 087 g/mL; Cedarlane). La fracción celular correspondiente fue procesada por selección negativa para obtener linfocitos B, utilizando Dynabeads® (mouse pan T, Invitrogen) como especifica el fabricante. En todos los ensayos la pureza se determinó por citometría de flujo como en el caso anterior y fue siempre > 90 %.

9.2.- Purificación de infiltrados pancreáticos

Páncreas recién extraídos se inocularon con ~1 mL de collagenasa P (0.8 mg/ mL; Roche) y DNasa (25 µg/ mL; Sigma) en PBS. A continuación, con un bisturí, se redujeron a fragmentos de < 1mm y se incubaron (10 minutos, 40°C) en 3 ml de la solución de collagenasa/ DNasa (1.2 mg/ mL; Sigma). El tejido, parcialmente digerido, se tamizó por filtros de 40 µm y se transfirió a tubos Falcon de 15 mL sobre un gradiente discontinuo de Percoll (GH Healthcare) al 40%, 50%, y 70%. Tras centrifugar (4°C, 30 min, 1800 rpm, sin freno) los linfocitos se localizan en la interface entre el 50 y el 70%. Se toma la interface con una pipeta Pasteur y las células se lavan exhaustivamente con medio HBSS estéril (3X, 1200 rpm, 4°C).

10.- Citometría de flujo

Las muestras marcadas fueron analizadas con un citómetro Cytomics FC 500 (Beckman Coulter) y el software FlowJo.

10.1.- Marcaje extracelular

Los órganos linfoides se disgregaron en PBS-EDTA 0,02 % como se ha descrito anteriormente. Se depositaron 10⁵ células/pocillo en placas de 96 pocillos con fondo en V. Las células se centrifugaron (1200 rpm, 5 min y 4°C) y se resuspendieron e incubaron con la solución del anticuerpo primario (0.5 µg/ pocillo, volumen final 30 µl, 30 minutos a 4°C) en PBS-marcaje (PBS pH 7,0; FBS 0.1 % y BSA 1 %). Las células se lavaron dos veces con PBS-marcaje, se centrifugaron (1200 rpm, 5 min y 4°C), resuspendieron e incubaron con el anticuerpo secundario (15 min, 4°C y oscuridad). Terminando el marcaje y tras lavar de nuevo las células con PBS-marcaje y resuspenderlas en 100 µL del mismo tampón, se analizó la fluorescencia unida a las células por citometría de flujo. Se adquirieron al menos 10⁴ eventos de la población de células vivas. Como control negativo se utilizaron anticuerpos irrelevantes con isotipo coincidente al de interés en cada caso.

10.2.- Marcaje extracelular en sangre

La sangre periférica se recogió con EDTA (0.02%) como anticoagulante. Se emplearon 50 μ L de sangre/tubo con la solución con el anticuerpo primario (0.5 μ g/ pocillo, volumen final 80 μ L, 30 minutos a TA) en PBS-marcaje, y se centrifugaron (1200 rpm, 5 min a 25°C). Las células se lavaron dos veces con PBS-marcaje, se centrifugaron (1200 rpm, 5 min y 4°C), resuspendieron e incubaron con el anticuerpo secundario (15 min, 4°C y oscuridad). Posteriormente se lisaron y resuspendieron las células en 200 μ L solución de lisis (VersaLyse®; Beckman Coulter). El análisis de las muestras es igual al descrito anteriormente.

10.3.- Marcaje intracelular

El marcaje intracelular en sangre se realizó a continuación del extracelular. Tras lavar los anticuerpos secundarios, las células se permeabilizan y fijan y, a continuación, se tiñen con el anticuerpo de interés marcado con PE (FoxP3 staining set®, eBioscience), siguiendo las indicaciones del fabricante.

11.- Ensayos *In-vitro*.-

11.1- Ensayos de proliferación

Se cultivaron en placas de 96 pocillos en fondo en U (Nunclon Surface) pretratadas

con 0.5 mg/ mL de anti-CD3 (16 horas, 4°C), 2.5×10^4 CD4⁺CD25⁻ fueron co-cultivados con 5×10^4 esplenocitos (previamente irradiadas, 20 Gy) como células accesorias. Triplicados de los cultivos se incubaron a 37°C en medio RPMI-1640 suplementados con 10% FBS, 2 mM L-glutamina, y 50 μ g/mL penicilina/estreptomicina. A las 48 horas, las células fueron sometidas a un pulso (16 h) con 1 μ Ci [³H] timidina (Perkin Elmer) por pocillo. La incorporación de ³H fue medido por espectrometría de centelleo líquido empleando un cóctel de CytoScint (MP Biomedical) y un contador MicroBeta 1450 (Perkin Elmer).

11.2.- Ensayo de supresión *In vitro*

Placas de 96 pocillos en fondo en U (Nunclon Surface) fueron pre-incubadas 16 horas con 0.5 mg/mL α -CD3 (BD Pharmingen) a 4°C. 2.5×10^4 células CD4⁺CD25⁻ fueron co-cultivados con células CD4⁺CD25⁺ a ratios variables (1:1, 2:1, y 4:1) y 5×10^4 células accesorias de bazo (previamente irradiadas, 20 Gy). A continuación se procedió como en los ensayos de proliferación.

11.3 Ensayos de activación de células B

Se cultivaron en placas de 96 pocillos en fondo en U (Nunclon Surface) esplenocitos B CD3-B220⁺ purificados por selección negativa, que fueron pre-incubados 30 minutos a 4°C, con

10 mg/mL α -IgM (Jackson Immuno research). 2.5×10^6 / mL linfocitos B fueron co-cultivados con hormona de crecimiento (5 μ g/mL) o sin ella. Se evaluó la activación de las células B a 0, 3 y 6 horas analizando por citometría de flujo la presencia de los marcadores CD86 y CD69. Los ensayos fueron preparados por triplicado en medio RPMI-1640 suplementado con 10% FBS, 2 mM L-glutamina, 2 mM HEPES, 30 μ M β -mercapto etanol.

12.- Ensayo de apoptosis inducida por estreptozotocina (STZ)

Los ratones fueron inyectados intraperitonealmente (i.p.), con STZ (Sigma, S0130) a 100 μ g/mL en tampón de citrato de sodio (0.1 M, pH 4,4). Cada ratón fue pesado e inyectado con una dosis diaria de 100 mg/ kg de STZ . La primera noche el agua de bebida fue suplementada con 10% de sacarosa para evitar un shock hiperinsulinémico. La monitorización de glucemia se realizó diariamente. Todos los individuos fueron sacrificados simultáneamente cuando uno de los grupos alcanzó valores medios de glucosa por encima de 350 mg/ dL. Los páncreas de los ratones fueron extraídos quirúrgicamente y fijados en PFA 4%, para su posterior inclusión en parafina. Secciones de 5 μ m se tiñeron con H&E para su evaluación. El análisis se realizó por inspección visual de las imágenes tomadas al microscopio a 40X.

13.- Técnicas de Biología Molecular

13.1 Lisados celulares totales

Las células aisladas de timo y ganglios periféricos se lisaron (30 min, 4°C y agitación constante) en 0.1 mL de tampón RIPA (RadioImmuno Precipitation Assay buffer, Tris-HCl 50 mM pH 7,6; desoxicolato sódico 0.25 % (Sigma-Aldrich), NaCl 150 mM y EDTA 1 mM) con una mezcla de inhibidores de proteasas y fosfatasas (NaF 25 mM, PMSF (fluoruro de fenilmetilsulfonilo) 1 mM, leupeptina 10 μ g/ mL, aprotinina 10 μ g/mL, ortovanadato sódico 1 mM). Los extractos celulares se centrifugaron (20.000 x g, 15 min y 4°C) para eliminar los restos celulares. En el sobrenadante se valoró la cantidad de proteína por el método del ácido bicinconínico (BCA, Thermo Scientific).

13.2 Separación electroforética y análisis por Western blot

Las muestras se diluyeron en tampón de Laemmli (4X) y se desnaturalizaron (5 min y 100°C) como paso previo a su separación electroforética. Se realizaron electroforesis en geles de poliacrilamida (8-12 %, dependiendo de las proteínas a estudiar) en condiciones desnaturalizantes (PAGE-SDS), tampón de electrodo (0.5 M Tris/ HCl p.H. 6,8), tampón de corrido (1.5 M Tris/ HCl pH 8,8). Una vez fraccionadas las proteínas se procedió a la transferencia a membranas de nitrocelulosa,

90 minutos, 200 mA. La homogeneidad de carga en las distintas muestras se comprobó por tinción con rojo Ponceau. Tras el lavado de la membrana con TBS, las membranas de nitrocelulosa de bloquearon (1 h y 25°C) con TBS-BSA 5% (para el análisis de proteínas fosforiladas). Una vez bloqueadas las membranas se incubaron (16 h, 4°C y agitación constante) con el anticuerpo específico para la proteína a estudiar en TBS-BSA 2%. Tras la incubación con el anticuerpo primario, se lavaron las membranas 3 veces con TBS-Tween 0.1% seguidos de 3 lavados con agua destilada. Las membranas se incubaron (45 min TA) con el anticuerpo secundario-HRP adecuado, en TBS-BSA 2%. Para la detección final de la proteína de interés en la membrana, está se incubó con ECL™ Western Blot Detection Reagents (Healthcare-GE) 1 min a TA. La señal luminiscente producida se detectó por exposición de películas radiográficas (Konica Minolta).

13.3.- Aislamiento de ARN total

El aislamiento de ARN a partir de tejidos pancreáticos, esplénicos y de ganglios periféricos se realizó con TriReagent® (Sigma) a 1 mL/ 0.1 gr de tejido, con homogeneización mecánica con un dispersor Ultra Turrax®, siguiendo el protocolo del fabricante.

13.4.- Síntesis de ADN complementario

Para la síntesis del ADN complementario (ADNc) se utilizaron entre 0.250 a 1 µg de ARN por muestra y se siguió el protocolo recomendado por el fabricante (Super Script First strand DNA synthesis, Invitrogen).

13.5.- RT-qPCR (PCR cuantitativa a tiempo real)

Las PCR cuantitativas y semicuantitativas se realizaron utilizando como método de detección de amplificación la sonda el SYBR-green. Estos experimentos se realizaron con un kit comercial según las recomendaciones del fabricante (Power SYBR Green PCR Master Mix (2x), Applied Biosystem). Todas las reacciones se realizaron en un termociclador a tiempo real (7900HT Real-Time PCR System; Applied Biosystem) en las siguientes condiciones:

Paso 1: 95°C x 10 minutos

Paso 2: 40 ciclos; 95°C x 0:15 segundos

60°C x 1:00 minutos

Paso 3: 95°C x 0:15 segundos

60°C x 0:15 segundos

Rampa 1 °C/ min

95°C x 0:15 segundos

Los valores umbral de detección (Ct) se normalizaron frente a los de β -actina y/o GAPDH como controles internos (Δ Ct). A continuación, las variaciones relativas encontradas en los ratones transgénicos respecto de los NOD se calcularon como $2^{-\Delta\Delta C_t}$. Las secuencias de los oligonucleótidos empleados en RT-qPCR se encuentran en la **tabla 3**.

14.- Tampones y medios de cultivo

1. En todos los casos de cultivos celulares se emplearon medio completo constituido por RPMI-1640 (Gibco, Life Technologies) suplementado con un 10% de suero de ternera fetal (FCS, Harlam, Sera Lab), 100 U/mL de penicilina, 100 μ g/mL estreptomicina, 2 mM de L-glutamina, 50 mM de

β -mercaptoetanol, 1mM de sodio-piruvato y 10 mM de HEPES pH 7,4 (Gibco, LifeTechnologies).

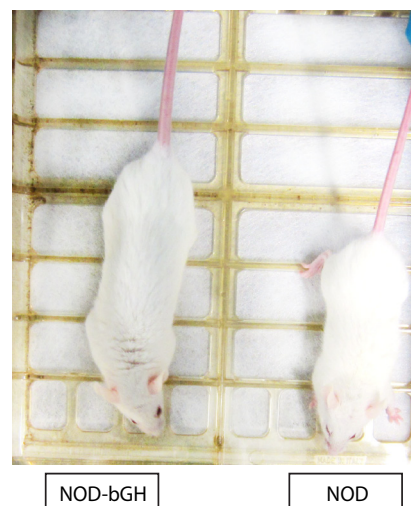
2. Medio Hanks Balance Salt Solution -HBSS (Gibco), estéril. Y solución tampón fosfato salino (PBS), pH 7,4.
3. Percoll™ (GE Healthcare), estéril.
4. TBST (Tris Buffer 0.05 M; Twenn® 20; p.H. 8,0).
5. TNB (Blocking Reagent; Roche).
6. Laemli (Tris/ HCl 1M, p.H. 6,8; SDS 20%; glicerol, azul bromofenol, DTT).
7. Tampón de transferencia (25 mM Tris p.H. 8,3; 192 mM Glicerina, 0.04 % SDS, 20 % Metanol).

RESULTADOS

1. Efectos de la GH en circulación: Exposición prolongada a GH circulante inhibe el desarrollo de la diabetes en ratones NOD

Para determinar el papel que tiene la hormona de crecimiento sobre el sistema inmunológico y en particular sobre la autoinmunidad decidimos usar el modelo de diabetes autoinmune, diabetes tipo 1, que se desarrolla en los ratones NOD. Cruzamos hembras NOD con machos transgénicos para la hormona de crecimiento bovina. En estos ratones transgénicos la expresión de bGH está controlada por el promotor de fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (PEPCK) de rata (Mcgrane et al., 1990), y por lo tanto es ubicua, con unos niveles constantes de GH circulante de 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Los ratones NOD-bGH se cruzaron con hembras NOD hasta la octava generación para asegurar un fondo puro y desde las primeras generaciones seleccionamos aquellos animales que poseían los polimorfismos de susceptibilidad a la diabetes en el locus *Idd3*. Los ratones resultantes presentaban la misma

A



B

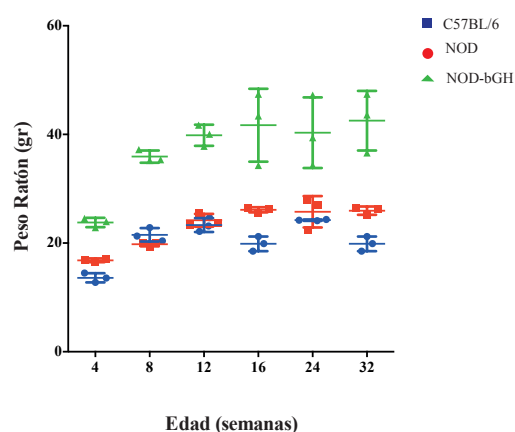


Figura 6.- A) Relación de tamaño entre los ratones NOD y NOD-bGH de 20 semanas de edad. B) Evolución del peso de los ratones hembras (C57BL/6, NOD y NOD-bGH). A lo largo de 32 semanas, n = 8.

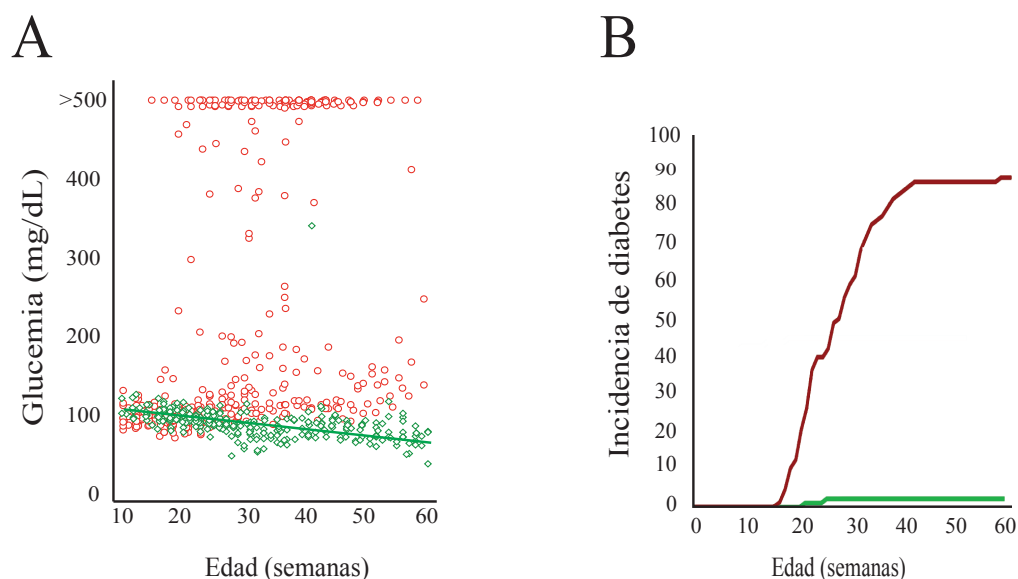


Figura 7.- A) Evolución de la hiperglicemia en ratones NOD (puntos rojos), y normoglucemia en NOD-bGH (puntos verdes) tras 60 semanas de mediciones de glucosa en sangre, dos mediciones mes por ratón, n=10 por grupo; B) Evolución de la curva de incidencia de diabetes en ratones hembra NOD, n=90 (línea roja) y NOD-bGH, n=89 (línea verde), durante 60 semanas. Coeficiente de Pearson, $r=-0.061$, $p<0.01$.

expresión de GH en circulación que los transgénicos progenitores y eran ratones sanos sin diferencias fenotípicas con los hermanos de camada no transgénicos (el transgen se expresa en heterocigosis), salvo el mayor tamaño de los NOD-bGH (**fig. 6 A-B**). Dado que el modelo NOD tiene mayor incidencia en los ratones hembra (Anderson, 2005), este proyecto se ha limitado a ratones hembra, vírgenes. En nuestras instalaciones, la incidencia de diabetes fue $>85\%$ antes de las 40 semanas de edad, incidencia que es similar a otras descritas en la bibliografía (Makino et al., 1980). El seguimiento de la diabetes tipo 1 se realizó por evaluación periódica de los niveles de glucosa en sangre. En estas condiciones, mientras los ratones NOD de ~ 40 semanas de edad alcanzaban valores de glucosa >300 mg/dL

y se consideraban diabéticos, los hermanos NOD-bGH mantenían valores <150 mg/dL con tendencia incluso a disminuir con la edad (**fig. 7 A**). La exposición prolongada a GH, redujo significativamente la incidencia de diabetes en los ratones NOD (**fig. 7B**).

1.1 Análisis histológico del páncreas.-

Para analizar la resistencia al desarrollo de la diabetes en los ratones NOD-bGH, comenzamos realizando estudios histológicos del páncreas, usando como controles ratones NOD (hermanos de camada), y ratones C57BL/6 (control sin diabetes) de 16 semanas de edad. Los ratones NOD-bGH presentan islotes pancreáticos gigantes, algunos de ellos están fusionados con otros, presentan

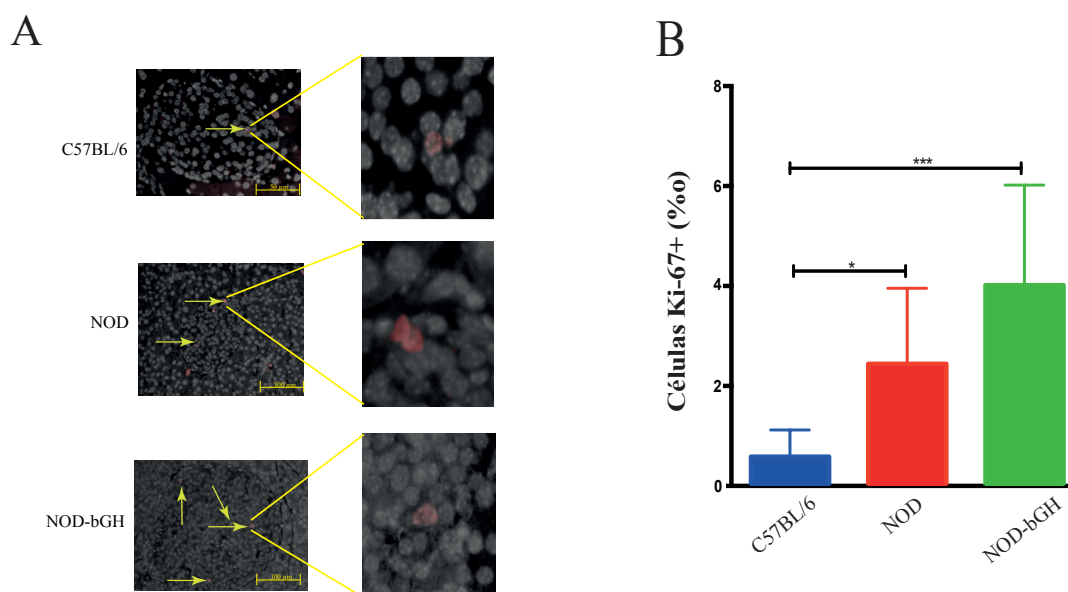


Figura 8.- Proliferación de células de islote. Secciones en parafina de páncreas de ratones C57BL/6 (azul, n=3), NOD (rojo, n=3), NOD-bGH (verde, n=3) de 16 semanas de edad. Las imágenes son representativas de tres ratones. A-B) Células Ki-67 positivas por cada 1000 células de Langerhans evaluadas por ratón analizadas por inmunofluorescencia y contra tinción DAPI; t-Student; *p<0.05; ***p<0.001.

morfología irregular, y presencia de infiltrados leucocitarios periinsulares, es decir, alrededor del islote, que raramente llegaban a penetrar en él. La fusión de islotes nos sugiere proliferación de las células β mediada por GH. Para confirmar esta observación realizamos tinciones de inmunofluorescencia con anticuerpo anti-Ki67 en secciones de páncreas de ratones de 16 semanas de edad. La presencia de la proteína nuclear Ki-67 es indicativa de actividad proliferativa ya que no se expresa durante la fase G_0 del ciclo celular (Scholzen & Gerdes, 2000). La cuantificación de las imágenes reveló un mayor número de células Ki67 positivas dentro de los islotes de ratones NOD-bGH que en los de ratones NOD. En ambos casos fue sin embargo superior al número de células positivas en los islotes del ratón

C57BL/6 a las 4 semanas de edad (**fig. 8**). La mayor cantidad de células β proliferativas en el ratón NOD comparado con el control C57BL/6 confirma observaciones previas (Sreenan et al., 1999), y el efecto inductor de la GH observado coincide con el previamente detectado para los estímulos con el lactógeno placentario (Brüel et al., 2007; Vasavada, 2000).

Además del efecto proliferativo inducido por la GH, es posible que la neogénesis de células β influya también en el aumento de masa observado en el páncreas del ratón NOD-bGH. La presencia del marcador PDX-1, factor de transcripción necesario para el desarrollo pancreático y la maduración de células β , en las paredes ductales del páncreas es un indicador de la diferenciación *de novo*

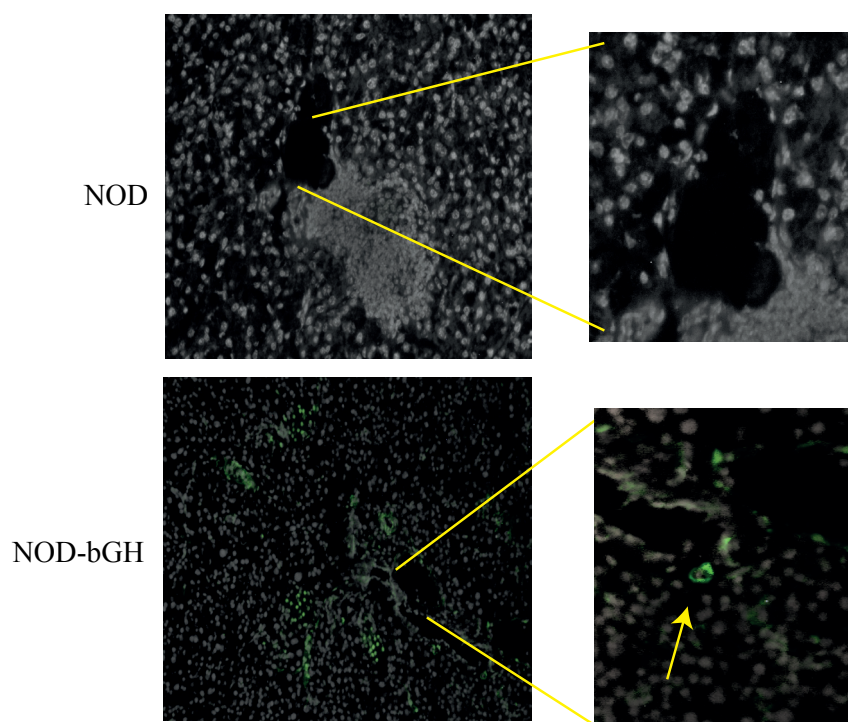


Figura 9.- Evaluación de células PDX-1⁺ en criosecciones de páncreas de ratones NOD y NOD-bGH de 20 semanas de edad. A) Imágenes representativas, de tinciones en inmunofluorescencia para PDX-1, se aprecian células positivas alrededor de paredes ductales, a diferencia del ratón NOD que no presenta ninguna célula PDX-1⁺. La flecha indica la presencia de células PDX-1⁺. En azul marcaje con DAPI de los núcleos celulares.

de células productoras de insulina (Bonner-Weir et al., 2010). La tinción con anti-PDX-1 en secciones de páncreas de ratones de 20 semanas de edad NOD, NOD-bGH y C57BL/6, demuestra la presencia de células PDX-1 positivas alrededor de ductos pancreáticos en el ratón NOD-bGH que no aparecen en el ratón NOD (**fig. 9**). Esto sugiere que, además del efecto sobre la proliferación de células β , la GH también estimula la renovación de células β a partir de precursores ductales.

Además de un efecto de la GH sobre la proliferación celular y renovación de células β , el mayor tamaño de los islotes puede indicar también un efecto de GH sobre la apoptosis celular. Determinamos los niveles de apoptosis espontánea en islotes de Langerhans, mediante una tinción con hematoxilina y eosina (H&E)

de secciones en parafina de páncreas de los ratones de 8 semanas de edad y cuantificación de células con núcleos picnóticos y morfología irregular. La evaluación de más de 1000 células de islote por ratón nos permitió detectar que los ratones NOD-bGH y C57BL/6 presentaban un menor número de células en apoptosis que los ratones NOD (**fig. 10**), aunque las diferencias no son estadísticamente significativas.

Dado que la baja frecuencia de la apoptosis espontánea dificulta la obtención de datos significativos, nos planteamos analizar si la GH afectaba a la apoptosis de células inducidas por tratamiento con estreptozotocina (STZ). La STZ ha sido ampliamente empleada en la inducción de apoptosis en las células β del páncreas, con el consiguiente desarrollo de diabetes en modelos de animales (Hayashi,

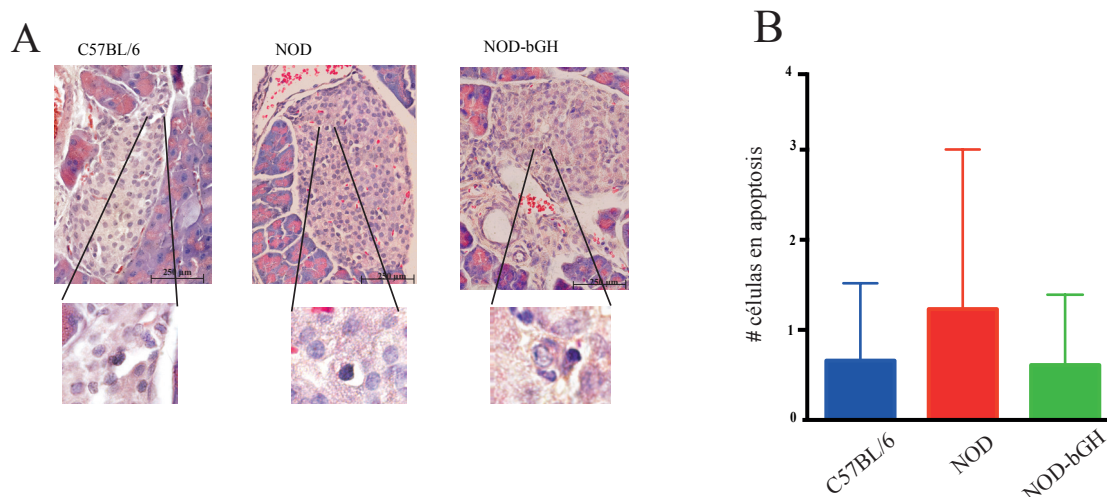


Figura 10- Evaluación de células en apoptosis espontánea. A) Secciones de páncreas en parafina teñidas con H&E son imágenes representativas de tres ratones C57BL/6 (azul, n=3), NOD (rojo, n=3), NOD-bGH (verde, n=3) de 8 semanas de edad. B) Número de células en apoptosis por cada 1000 células analizadas.

2006). Los efectos de la STZ sobre las células β son similares a los de la IL-1 β que estimula la liberación endógena de óxido nítrico, NO, provocando la destrucción de las células β y la consiguiente diabetes (Turk et al., 1993). Para ello empleamos ratones C57BL/6, NOD y NOD-bGH de 8 semanas de edad, en los que inyectamos vía intraperitoneal (i.p.), STZ. Realizamos un seguimiento durante los siguientes 4 días, determinando los niveles de glucosa en circulación y sacrificamos los ratones hiperglicémicos para posteriormente realizar un análisis histológico del páncreas (fig. 11). Analizando los islotes por tinción H&E, observamos que hay mayor número de

células en apoptosis en los ratones NOD-bGH y de hecho también alcanzaban hiperglicemia con anterioridad a los otros dos tipos de ratones, aunque el número bajo de ratones empleados para formar los grupos influye negativamente en la significatividad estadística del resultado. Como control observamos mediante tinción con anticuerpo anti-glucagón que las células sensibles a STZ no eran las células α productoras de glucagón. Los datos sin embargo sugieren que la GH no provoca resistencia a la apoptosis inducida de las células β .

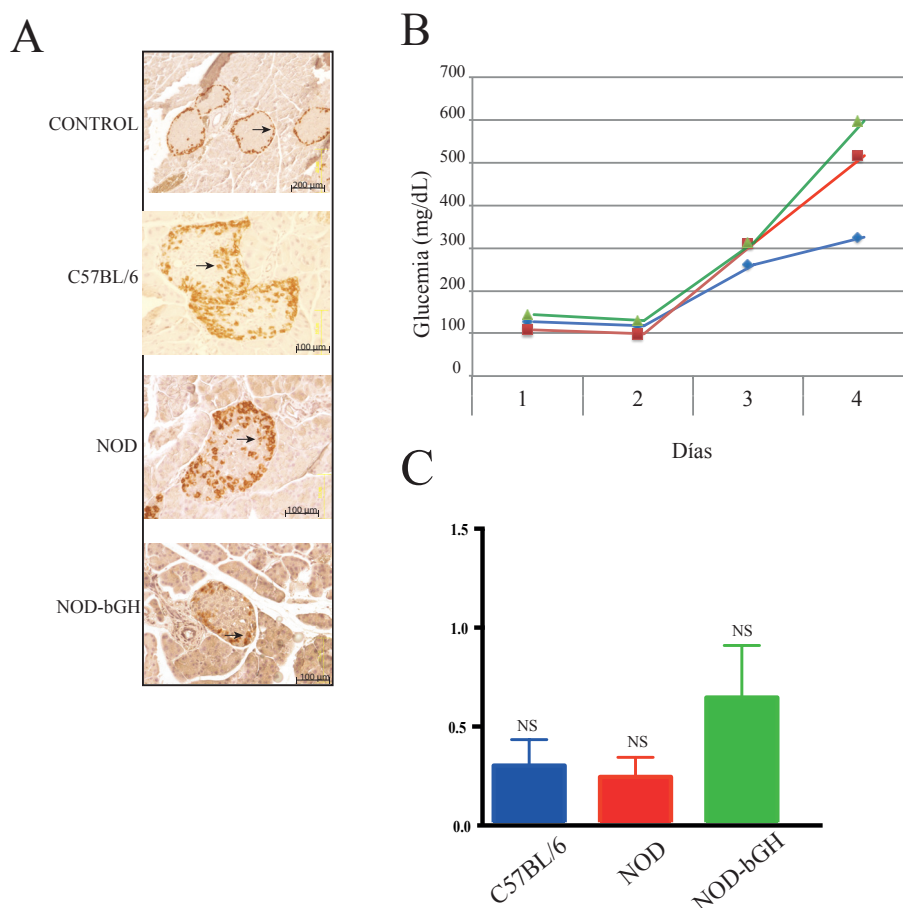


Figura 11- Ensayo de inducción de apoptosis por STZ. A) Cortes representativos de pancreas marcados con anticuerpos anti-glucagón, y contra tinción en hematoxilina. B) Curva de glucemia de ratones tratados con STZ en función del tiempo tras el tratamiento, C57BL/6 (línea azul, n=2), NOD (línea roja, n=2), y NOD-bGH (línea verde, n=2). C) Cuantificación de células en apoptosis por cada mil células analizadas, C57BL/6 (barra azul, n=2), NOD (barra roja, n=2), y NOD-bGH (barra verde, n=2). Prueba t Student; NS, no significativos.

1.2 Composición de los infiltrados pancreáticos

Una vez caracterizados la morfología de los islotes, y los efectos de la GH sobre la viabilidad de las células β del islote pasamos a caracterizar el infiltrado pancreático leucocitario. Los islotes se encuentran rodeados de células del sistema inmune como paso previo al inicio de la respuesta autoinmune específica contra las células β productoras de insulina. Se analizó por citometría de flujo y por inmunohistoquímica

la composición de los infiltrados pancreáticos de ratones de 16 semanas de edad. Infiltrados mononucleares de ratones NOD, y NOD-bGH obtenidos por disgregación del tejido pancreático y purificados en gradiente de Percoll se analizaron por citometría de flujo marcando las células con CD4, CD8, y B220. Los datos indicaron mayor porcentaje de células CD8⁺ en los ratones NOD, lo que nos sugiere un retraso en el caso de los ratones transgénicos, ya que las células CD8⁺ están involucradas en la etapa final del desarrollo de la diabetes (Lieberman

et al. 2003). Sin embargo encontramos que en el resto de poblaciones no existen diferencias significativas entre los ratones (**fig. 12**). Además, marcando criosecciones de páncreas de los mismos ratones con anticuerpos anti-CD4, anti-CD8, anti-F4/80, anti-CD11c y anti-

BB20, observamos que a pesar de las diferencias en localización, la composición celular de ambos infiltrados fue similar, detectando células T efectoras, células citotóxicas, células B, monocitos/macrófagos, células dendríticas y neutrófilos (**fig. 13**).

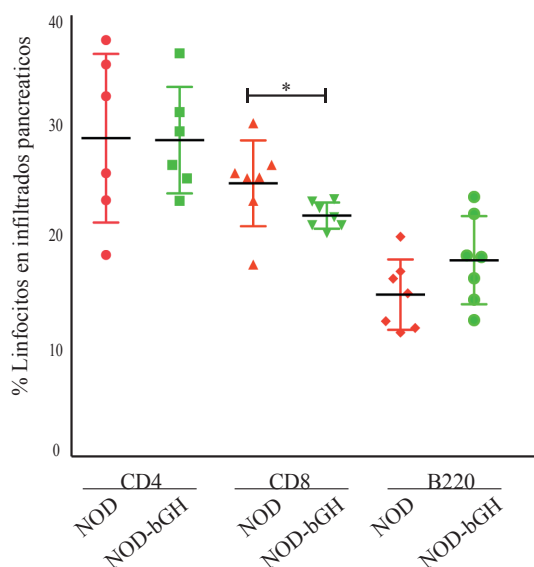


Figura 12.- Porcentajes de células de infiltrados mononucleares de ratones NOD y NOD-bGH de 16 semanas de edad, analizadas por citometria de flujo empleando los marcadores anti-CD8, -CD4, -B220, -CD11b. Prueba t Student, * $p < 0.05$.

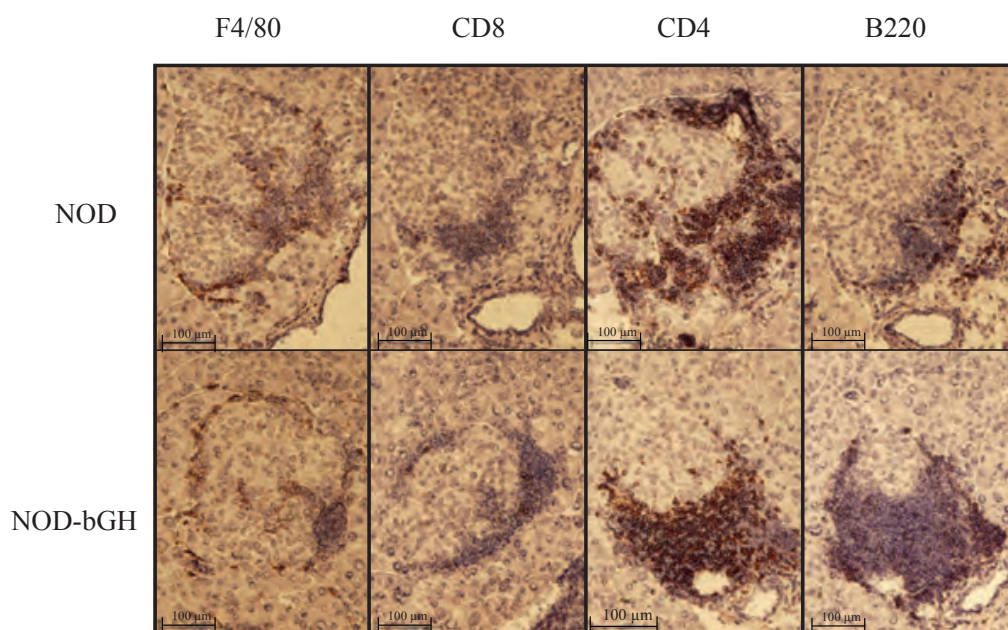


Figura 13.- Secciones de páncreas de ratones NOD, y NOD-bGH de 16 semanas de edad, inmunohistoquímica con tinción para F4/80, CD8, CD4, BB20, contra-tinción con hematoxilina. Barra: 100 μ m.

2.- Síntomas pre-clínicos en el ratón NOD-bGH

El entorno inflamatorio que se genera con el agrupamiento de células mononucleares alrededor de los islotes pancreáticos, forma parte de la fase inicial de la diabetes tipo 1 (Mathis, Vence, & Benoist, 2001). Hemos analizado la cinética de aparición, y dinámica de los infiltrados, así como el tamaño de los islotes en secciones de páncreas, teñidas con H&E, de ratones C57BL/6, NOD, y NOD-bGH a 4, 8, 12, 16, 20 y 24 semanas de edad. El infiltrado leucocitario aparece antes en el ratón NOD que

en el NOD-bGH. Además, el infiltrado, en el caso del ratón NOD-bGH, no progresa hasta la invasión del islote, e incluso a las 24 semanas de edad se mantiene la periinsulitis con islotes intactos. En los ratones NOD, la periinsulitis inicial progresa rápidamente hacia el interior del islote. A las 12 semanas de edad un 25 % de los islotes en ratones NOD presenta ya una grave afección que alcanza el 50 % en ratones de 20 semanas (**fig. 14**). Este hecho coincide con la drástica reducción en la masa de los islotes detectados a esa edad en los ratones NOD (**fig. 15**).

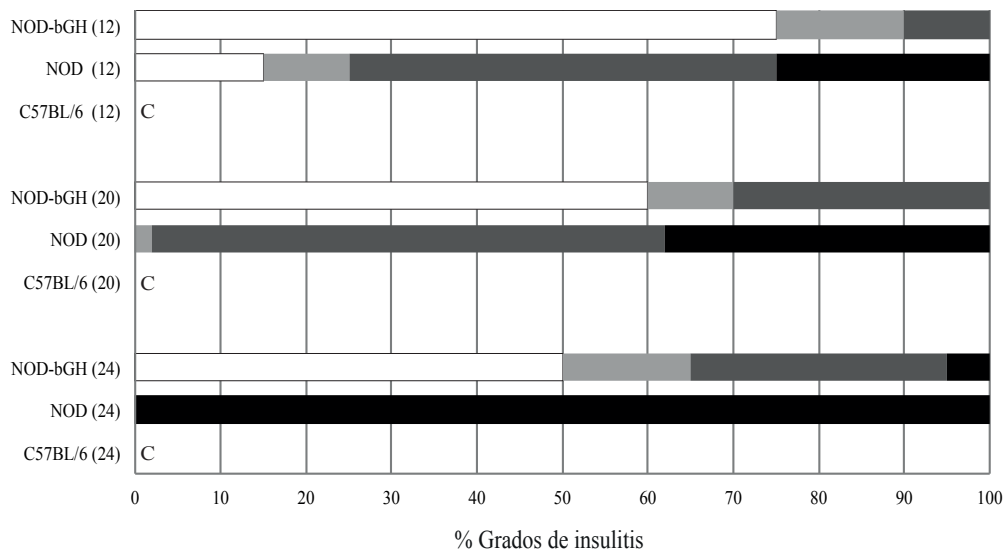


Figura 14.- Cuantificación de insulitis en islotes pancreáticos. Entre 50 y 100 islotes por páncreas fueron analizados visualmente tras tinción con H&E. Se representan los datos de ratones C57BL/6 (control), NOD, y NOD-bGH a las 12, 20 y 24 semanas de edad (tres ratones por grupo). Se midieron los grados de infiltración por células mononucleares, y el análisis fue llevada por dos personas, de manera independiente, siguiendo los siguientes criterios: 0, normal (blanco); 1, periinsulitis temprana (gris claro); 2, periinsulitis grave (gris oscuro); 3, insulitis (negro). C: control sin infiltrados, como se ha descrito en la sección de métodos.

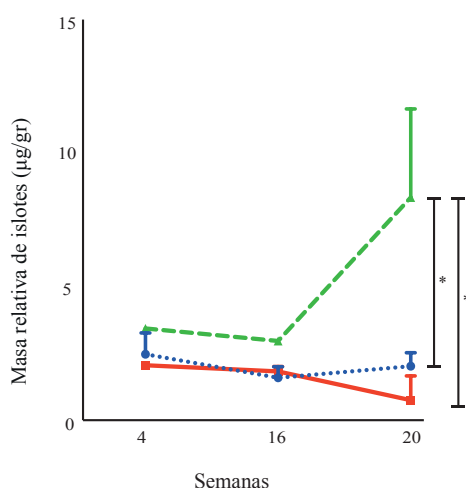


Figura 15.- Evaluación de la masa relativa de los islotes pancreáticos, representada como microgramos de islote por gramo de peso del ratón, en función de la edad del mismo. Cada punto representa la media de las observaciones para 3 ratones C57BL/6 (línea azul, n= 3 por cada grupo de edad), NOD (línea roja, n= 3 por cada grupo de edad), y NOD-bGH (línea verde, n= 3 por cada grupo de edad), con su desviación estándar. Prueba ANOVA, *p<0.05.

2.1.- Integridad estructural de los islotes pancreáticos

Histológicamente los islotes pancreáticos están rodeados por una capa de células de Schwann que forman una lamina basal caracterizada por la expresión de laminina (Delarche, 2004). Se trata de una barrera física que separa el islote del tejido pancreático exocrino. En el desarrollo de la diabetes, esta barrera se rompe por acción de los infiltrados mononucleares como paso previo a la invasión

del islote y a la destrucción de las células β productoras de insulina (Homo-Delarche & Drexhage, 2004). A las 16 semanas el ratón NOD presenta una completa destrucción de la capa de Schwann y consecuentemente un gran infiltrado leucocitario se apodera del islote. En el ratón NOD-bGH la capa de laminina se observa intacta incluso en ratones de 20 semanas (**fig. 16**), a pesar de la periinsulitis. Es posible que una falta de actividad invasiva por parte de los infiltrados mononucleares en ese ratón esté detrás de ese efecto. El resultado

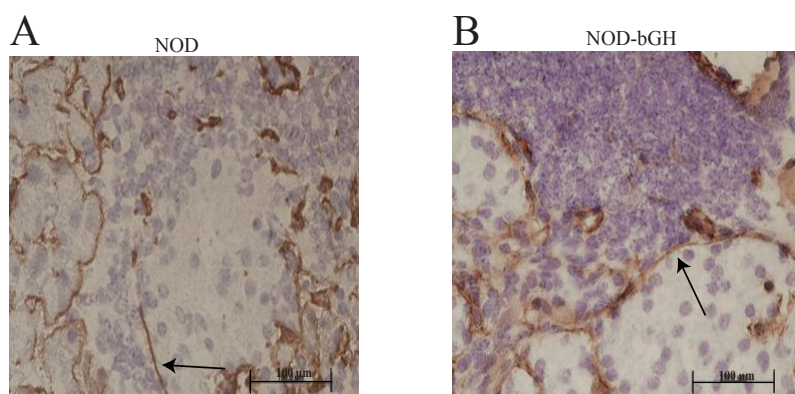


Figura 16.- Integridad del islote observado por inmunohistoquímica, en secciones de páncreas de ratones NOD y NOD-bGH de 20 semanas de edad. A-B) Secciones marcadas con anti-laminina y contra-tinción con hematoxilina, en la cual se observa en los ratones NOD que la capa de laminina está degradada y las células mononucleares invaden al parénquima del islote; a diferencia del ratón NOD-bGH que se observa que la capa de laminina está intacta, aun cuando se observen abundantes infiltrados periinsulares. Barra: 100 μ m; aumento 40X. La flecha indica la presencia de células de Schwann.

final es la presencia de un mayor número de células productoras de insulina en los islotes de los ratones NOD-bGH, y su práctica destrucción en los ratones NOD (**fig. 17 A-B**). A las 24 semanas de edad si detectamos en los ratones NOD-bGH algún infiltrado leucocitario en el islote pero realmente son infiltrados perivasculares que no desarrollan en ningún caso una invasión completa del islote (**fig. 17 C-D**) como la observada en los ratones NOD.

2.2.- Funcionalidad de las células β

La respuesta inmunitaria humoral es ampliamente empleada para el diagnóstico temprano de la diabetes tipo 1 (Nakayama et al., 2005), ya que su presencia precede en el tiempo los síntomas clínicos de la enfermedad. Por esa razón determinamos la presencia de anticuerpos anti-insulina en ratones NOD

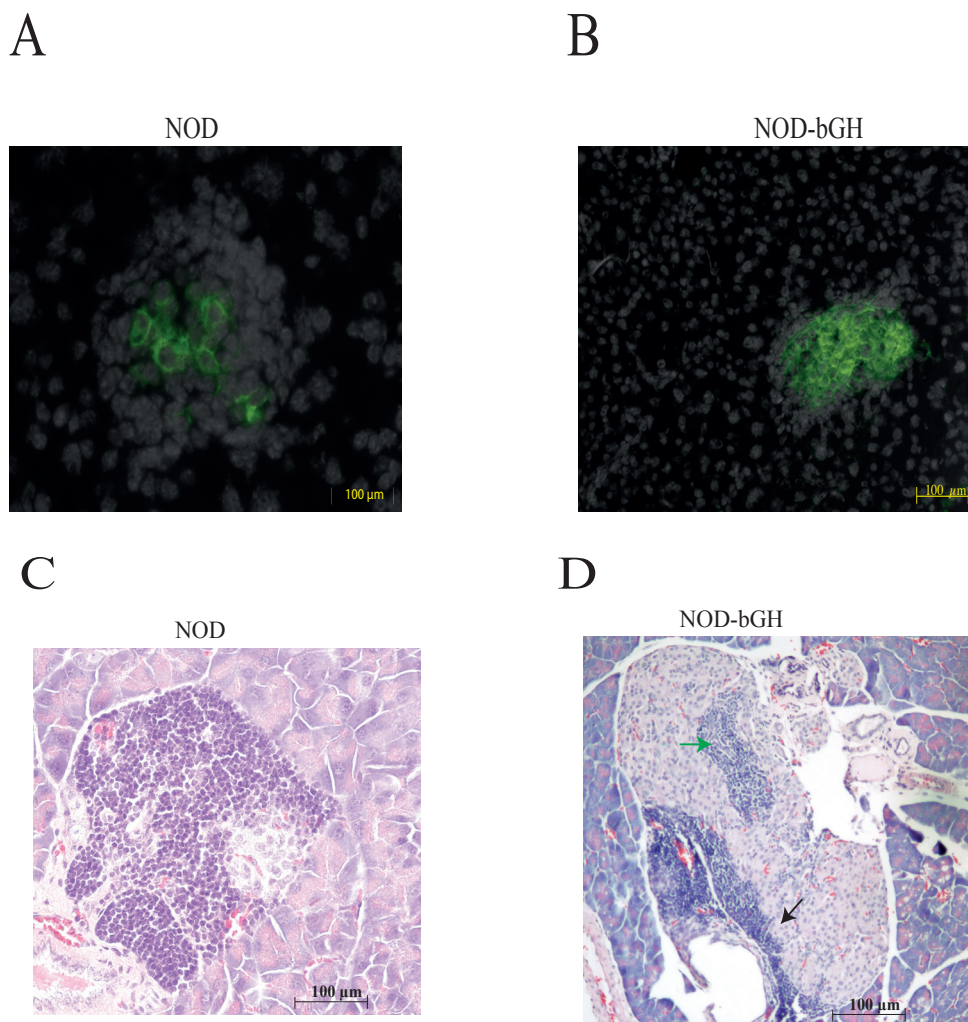


Figura 17.- Integridad de las células β productoras de insulina, en ratones NOD y NOD-bGH de 20 semanas de edad. A-B) Inmunofluorescencia anti-insulina (verde), y tinción de núcleos con DAPI (gris); NOD (infiltrado), y NOD-bGH (periinsulitis leve que mantiene más número de células β produciendo insulina). C) Sección de páncreas, teñida con H&E, de ratón NOD de 24 semanas de edad con una infiltración de células mononucleares. Se aprecia una invasión y destrucción de células β . D) sección del páncreas del ratón NOD-bGH de 24 semanas de edad con una periinsulitis intra islote (flecha negra), y periinsulitis insular (flecha verde).

pre-diabéticos y NOD-bGH, usado ratones C57BL/6 como control negativo. En ratones de 12 semanas de edad observamos que mientras en los ratones NOD existía un título alto de anticuerpos anti-insulina, confirmando el daño en el islote, los ratones NOD-bGH presentaban un título muy bajo que coincide con la falta de destrucción del islote, con la ausencia de insulitis y con el mantenimiento de la normoglicemia (**fig. 18**). Las causas de esa falta de respuesta humoral pueden buscarse en diferentes lugares. Por un lado la GH podría provocar defectos en la activación de las células B o afectar a la presentación antigénica. Analizamos primero los niveles de inmunoglobulinas totales en sangre de estos ratones, observando que no había diferencias entre ratones NOD y NOD-bGH (**fig. 19**).

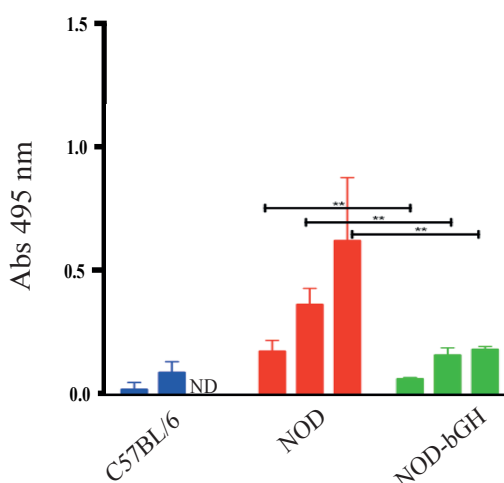


Figura 18.- Determinación de insulina por ELISA. Detección de anticuerpos anti-insulina en sueros de ratones C57BL/6 (azul, n= 3, control), NOD (rojo, n=7), NOD-bGH (verde, n=5) de 12, 16, y 20 semanas de edad. Prueba t-Student; **p<0.01.

Decidimos entonces purificar por selección negativa células B del bazo de ratones NOD y NOD-bGH y analizar si entre ellas existían diferencias al activarlas *in-vitro* con anticuerpos anti-IgM (10 µg/mL) durante 3 y 6 horas. El estudio por citometría de flujo con marcadores de activación en las células B (CD69 y CD86) (**fig. 20**), demostró que tampoco había diferencias en ese aspecto entre

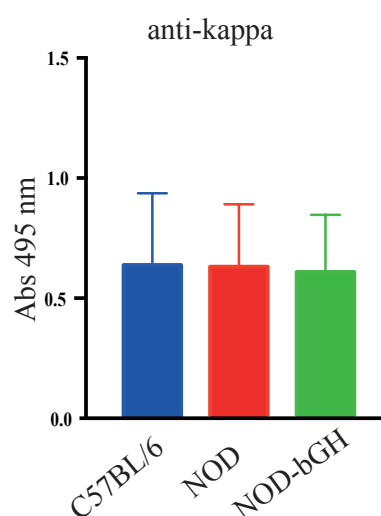


Figura 19.- Detección de Ig total por ELISA con anti-Ig cadena kappa en los sueros de ratones. C57BL/6 (barra azul, n=6), NOD (barra roja, n=3), y NOD-bGH (barra verde, n=6).

las células de ambos tipos de ratones. El estudio se repitió con una aportación exógena de GH para suplir el déficit de la misma asociado a la realización *ex-vivo* del experimento. Esta variable no tuvo efecto sobre los resultados. Finalmente decidimos estudiar la capacidad de generar anticuerpos específicos contra un antígeno concreto. Para ello inmunizamos a los ratones C57BL/6, NOD y NOD-bGH vía intraperitoneal con 100 µg de ovalbúmina

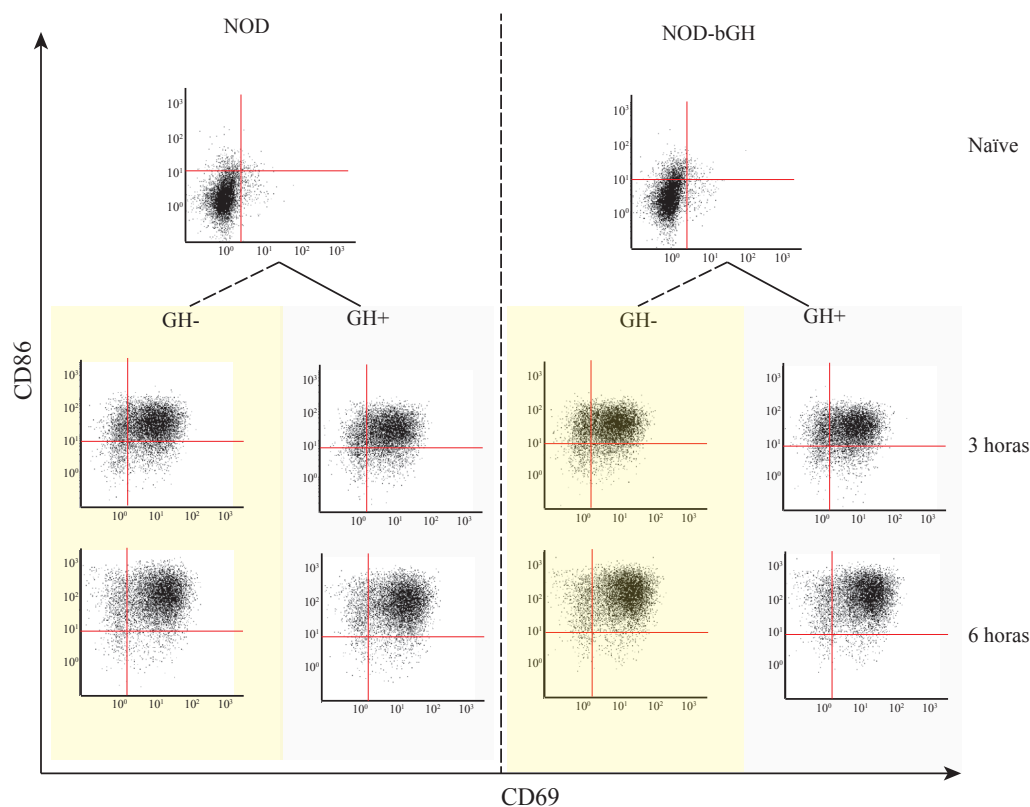


Figura 20.- Activación de células B purificadas Efecto de la GH en la activación *in vitro* de células B primarias con anticuerpos anti-IgM. Células B aisladas por selección negativa de bazo de ratones NOD o NOD-bGH fueron activadas *in vitro* con anti IgM (10 μ g/ mL) en presencia o ausencia de GH (5 μ g/ mL). La activación se puso de manifiesto por citometría de flujo con anticuerpos anti-CD69 y anti-CD86.

en adyuvante completo de Freund y 30 días después se dio una segunda dosis con 25 μ g de ovalbúmina en adyuvante incompleto de Freund. Los ratones se sangraron 12 y 30 días después de la primera dosis, y 15 días después de la segunda dosis y analizamos en el suero la presencia de IgM e IgG específicas del antígeno mediante un inmunoensayo con el antígeno usado. Los ratones NOD-bGH presentaron un título anti-ovalbúmina mucho menor que los ratones NOD o los ratones C57BL/6, tanto para IgM como para IgG. El efecto se observó incluso tras la segunda dosis con ovalbúmina (**fig. 21**). Estos datos sugieren con fuerza un

defecto en la presentación antigénica en los ratones NOD-bGH, algo apuntado en trabajos previos (Hall et al., 2002).

3.- Los niveles de GH circulante son responsables del fenotipo protector

La presencia de infiltrado leucocitario y el papel de la hormona de crecimiento como activador de la respuesta inmune, nos llevó en primer lugar a determinar si existían diferencias en las diferentes poblaciones de células del sistema inmunológico, tanto en los órganos linfoides secundarios (bazo, ganglios

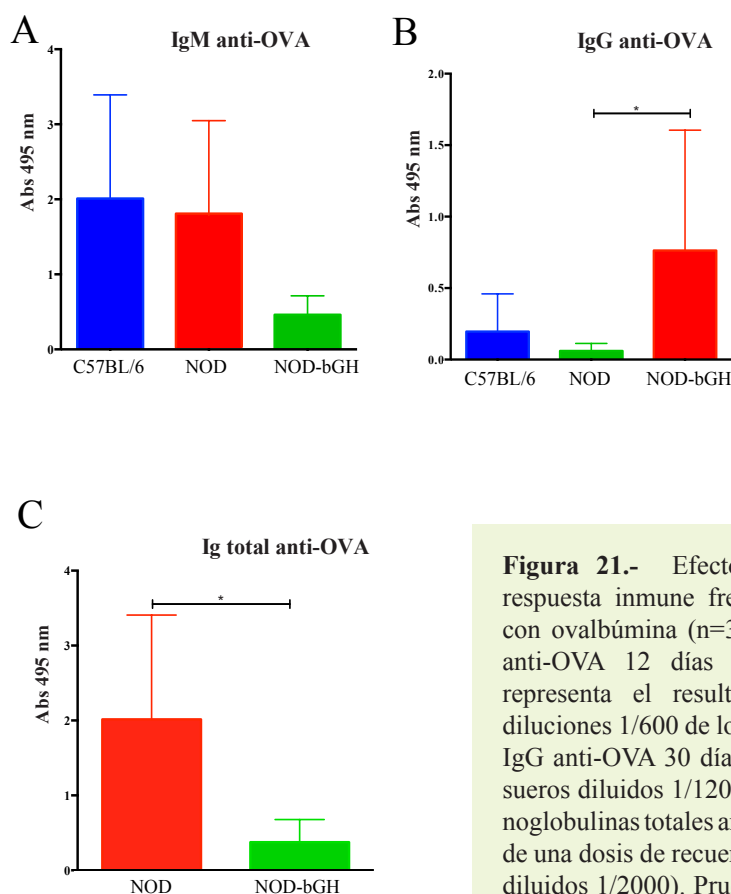


Figura 21.- Efecto de la GH sobre la respuesta inmune frente a la inmunización con ovalbúmina (n=3). A) Niveles de IgM anti-OVA 12 días post-inmunización. Se representa el resultado del ELISA para diluciones 1/600 de los sueros. B) Niveles de IgG anti-OVA 30 días post-inmunización en sueros diluidos 1/1200. C) Niveles de inmunoglobulinas totales anti-OVA 15 días después de una dosis de recuerdo del antígeno (sueros diluidos 1/2000). Prueba t-Student; $p < 0.05$.

linfáticos), como en la periferia (sangre). Los ensayos por citometría de flujo con marcadores específicos no muestran ninguna diferencia entre las poblaciones inmunológicas de ratones NOD y NOD-bGH (**Tabla. 4**). Además la tinción con marcadores de activación (CD25, CD69, CD44 y CD62L) también demostró niveles similares en las células CD3⁺ aisladas de ganglios linfáticos de ambos tipos de ratones (**fig. 22**).

Dado que trabajos previos han demostrado que la GH puede modular las respuestas de las células T (Gonzalo et al.1996), realizamos un ensayo de hipersensibilidad

retrasada (DTH: delayed type hypersensitivity) usando como estímulo esplenocitos alogénicos. Este tipo de ensayos consiste en sensibilizar ratones NOD y NOD-bGH mediante una inyección intravenosa de esplenocitos de ratones C57BL/6 y seis días después reestimar con esplenocitos inyectados en la almohadilla plantar de los ratones. A continuación se va determinando el grado de inflamación en la pata hasta completa remisión, usando como control el calibre de la otra pata que sólo recibió vehículo. Las medidas realizadas demostraron que la inflamación fue similar en ambos tipos de ratones tanto en volumen como en duración (**fig. 23**).

		NOD	NOD-bGH
Sangre Periférica	CD8	18.50 ± 2.33	19.62 ± 3.08
	CD4	33.82 ± 2.01	33.13 ± 3.62
	B220	4.72 ± 0.22	5.80 ± 0.48
	CD11b	1.09 ± 0.11	1.07 ± 0.04
	Gr-1	9.65 ± 0.15	9.65 ± 2.64
Bazo	CD8	12.22 ± 1.54	14.32 ± 2.16
	CD4	22.91 ± 3.28	21.83 ± 4.54
	B220	44.90 ± 3.65	45.24 ± 3.62
	CD11b	3.67 ± 1.08	2.98 ± 1.14
	Gr-1	1.65 ± 0.33	2.04 ± 0.65
Ganglios linfáticos	CD8	21.43 ± 2.33	20.98 ± 2.24
	CD4	58.58 ± 2.01	57.83 ± 2.73
	B220	14.27 ± 0.22	15.75 ± 1.84
	CD11b	ND	ND
	Gr-1	ND	ND

Tabla 4.- Evaluación de las distintas poblaciones de células inmunes en distintas localizaciones (sangre periférica, bazo, ganglios linfático) de ratones NOD, y NOD-bGH de 16 semanas de edad. Los porcentajes corresponden al porcentaje de células positivas ± SD (n= 3). ND, no determinado.

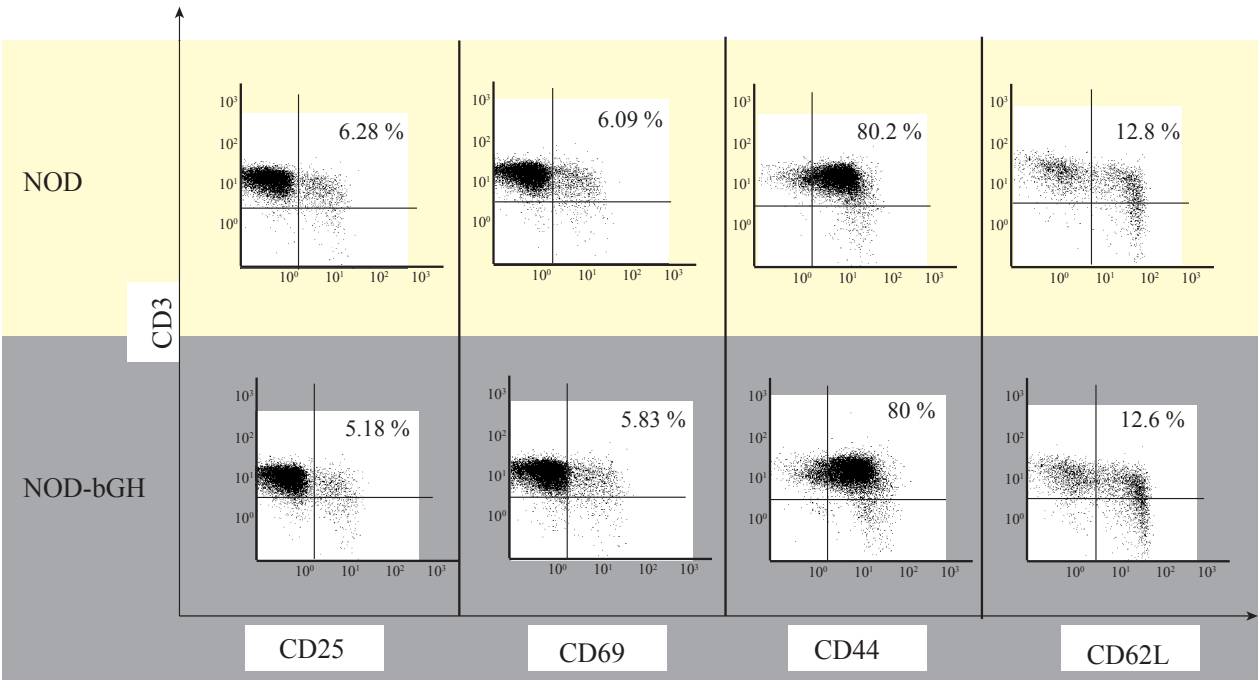


Figura 22.- Evaluación del estado de activación de las células T en ratones NOD y NOD-bGH de 16 semanas. Se presenta el marcaje con CD25, CD69, CD44, y CD62L. Los porcentajes corresponden al porcentaje de células positivas ± SD (n= 3). ND, no determinado.

Algunos trabajos subrayan que la conversión de células Th17 a Th1 es imprescindible para que se desarrolle diabetes autoinmune (Shao, 2012) y por otro lado se ha puesto de manifiesto que la patología es típicamente Th1 y que de hecho un cambio en la polarización de la respuesta a Th2 tiene efectos protectores sobre los islotes pancreáticos (Lin et al., 2011).

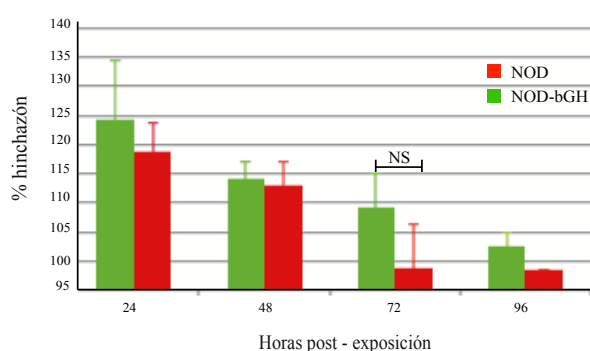


Figura 23- Ensayo de hipersensibilización retrasada. Se muestra la inflamación a distintos tiempos de la extremidad a nivel de la almohadilla plantar en relación a sus estado a tiempo 0. Barras de error: desviación estándar. La prueba t de Student no muestra diferencias significativas.

Por otro lado, dado que la GH usada como adyuvante en algunas vacunas favorece la respuesta Th2 sobre la Th1 (Del Real et al., 1998), evaluamos el perfil de citoquinas en sangre de ratones NOD y NOD-bGH. Los ensayos de BioPlex®, claramente pusieron de manifiesto un incremento significativo de los niveles de IFN- γ , IL-4, IL-13, IL-17A y TNF- α en el suero de los ratones NOD-bGH comparado con los ratones NOD (fig. 24). Para apreciar más en detalle si esos niveles realmente

correspondían con cambios fenotípicos de la respuesta T, analizamos los datos obteniendo la relación de citoquinas Th2/Th1 y Th17/Th1. Este análisis confirmó un efecto de la GH sobre la polarización de la respuesta T al detectarse en los ratones NOD-bGH un déficit relativo de respuesta Th1 (fig. 25).

Decidimos entonces caracterizar más en detalle cuál era el papel de la respuesta adaptativa y si la GH circulante era capaz de modificarla. Para ello analizamos la población de células T efectoras y las células T supresoras. La diabetes autoinmune puede transferirse adoptivamente mediante el trasplante de células diabetogénicas de un ratón diabético en ratones jóvenes, pre-diabéticos, de una línea susceptible como NOD (Wicker et al., 1986). En tal caso la enfermedad se desarrolla rápidamente observándose hiperglicemia a los 15 días del trasplante. Los ratones receptores postpubertales necesitan sin embargo recibir previamente dosis subletales (6-7 Gy) de radiación y los híbridos de cepas resistentes y cepas susceptibles requieren irradiaciones letales (12 Gy) para desarrollar diabetes tras el trasplante. Realizamos primero ensayos de trasplante de esplenocitos de ratones NOD-bGH en ratones receptores NOD y NOD-bGH irradiados subletalmente (7 Gy). Los esplenocitos del ratón NOD-bGH no protegieron al ratón NOD del desarrollo de la diabetes poniendo de manifiesto que las células del ratón trans-

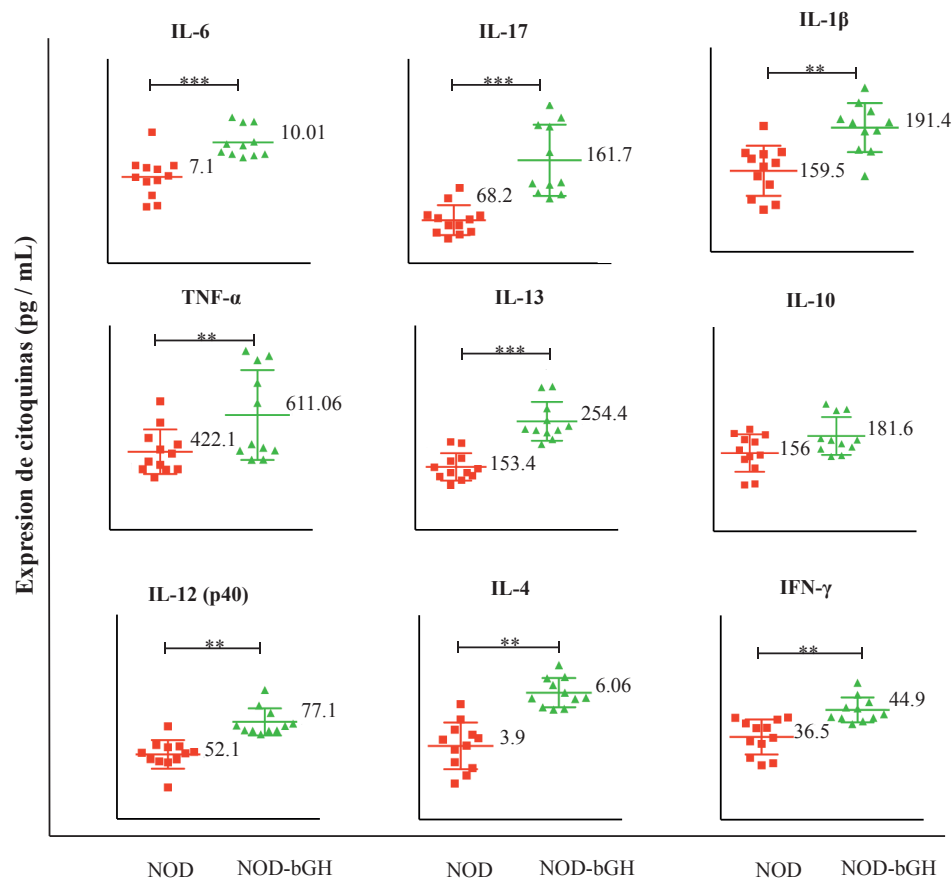


Figura 24.- Determinación de los niveles de citoquinas. Los niveles de diferentes citoquinas según se indican se evaluaron mediante tecnología BioPlex Pro® en sueros de NOD prediabético (rojo, n= 12) y NOD-bGH (verde, n= 11) de 16 semanas de edad. Se representa la media \pm SD. El análisis estadístico se realizó por prueba ANOVA; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

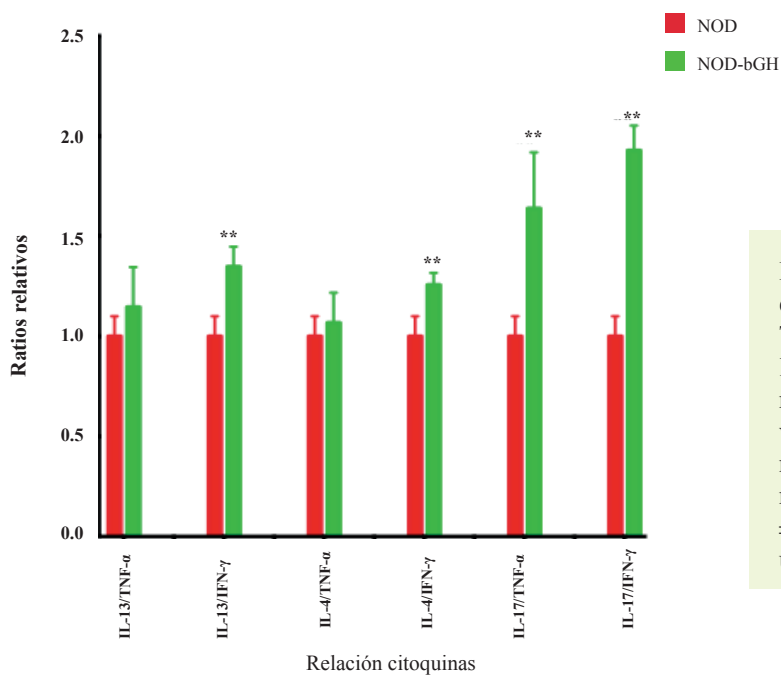


Figura 25.- Evaluación de la expresión relativa de citoquinas Th2/Th1 y Th17/Th1. Se representan las medias en ratones NOD (barra roja, n=12), y NOD-bGH (barra verde, n=11). Los valores fueron normalizados para los valores de ratones NOD. Se representa media \pm SD. El análisis estadístico incluyó una prueba t Student. ** $p < 0.01$.

génico NOD-bGH no tienen la misma actividad supresora fuera del contexto en el ratón NOD (**fig. 26 A**). Además, las células del ratón NOD-bGH no aceleraron el desarrollo de la diabetes en el ratón NOD irradiado subletalmente (**fig. 26 B**), indicando que no existen células efectoras entre los esplenocitos de los ratones NOD-bGH.

La falta de actividad supresora de las células reguladoras ($CD4^+CD25^+FoxP3^+$) en los ratones NOD acelera la aparición de diabetes tipo 1 (Brode et al. 2006). Decidimos entonces estudiar el papel que las células T reguladoras juegan en el fenotipo observado en los ratones NOD-bGH. Para ello transferimos 2×10^7 esplenocitos obtenidos de un grupo de tres ratones NOD de 24 semanas de edad, con diabetes desarrollada, en ratones NOD-bGH de 6 semanas de edad irradiados subletalmente (7 Gy). En estos ratones no se desarrolló la diabetes mientras, como era, de esperar los síntomas se aceleraron cuando se usaron ratones NOD no transgénicos hermanos de camada como receptores (**fig. 26 C**). Estos resultados indican la existencia de un mecanismo de supresión en los ratones NOD-bGH irradiados que es capaz de bloquear a las células efectoras procedentes del ratón NOD y que no existe en los ratones NOD.

Algunos estudios indican que las células T reguladoras son relativamente radioresistentes

(Komatsu & Hori, 2007), ante la posibilidad de que este aspecto pudiera influir en los resultados del experimento anterior, decidimos repetir la transferencia de esplenocitos pero en ratones de 3 semanas de edad NOD y NOD-bGH irradiados con una dosis letal (12 Gy). En ambos casos la reconstitución rescató de la letalidad, pero mientras los NOD presentaron hiperglicemia a los 7-10 días, los NOD-bGH se mantuvieron normoglicémicos (**fig. 26 D-C**). Ratones control irradiados de ambos genotipos pero que no recibieron transferencia de esplenocitos murieron durante la primera semana tras la irradiación. Estos resultados confirman la idea de la existencia de un mecanismo de supresión sobre las células diabetogénicas en los ratones NOD-bGH que es capaz de resistir altas dosis de radiación.

Intentamos por último transferir la resistencia al desarrollo de la enfermedad usando un modelo de ratones sensible a la inducción de diabetes e inmunodeficiente. Los ratones NOD/SCID (severe combined immunodeficiency), no presentan ninguno de los síntomas autoinmunes, pero la diabetes es fácilmente inducible mediante la transferencia adoptiva de células diabetogénicas. Usamos, entonces 2 grupos de ratones NOD/SCID de 12 semanas de edad y los inoculamos vía intravenosa con 2×10^7 esplenocitos procedentes de ratones NOD de 20 semanas de edad. Uno de los grupos recibió además 2×10^7

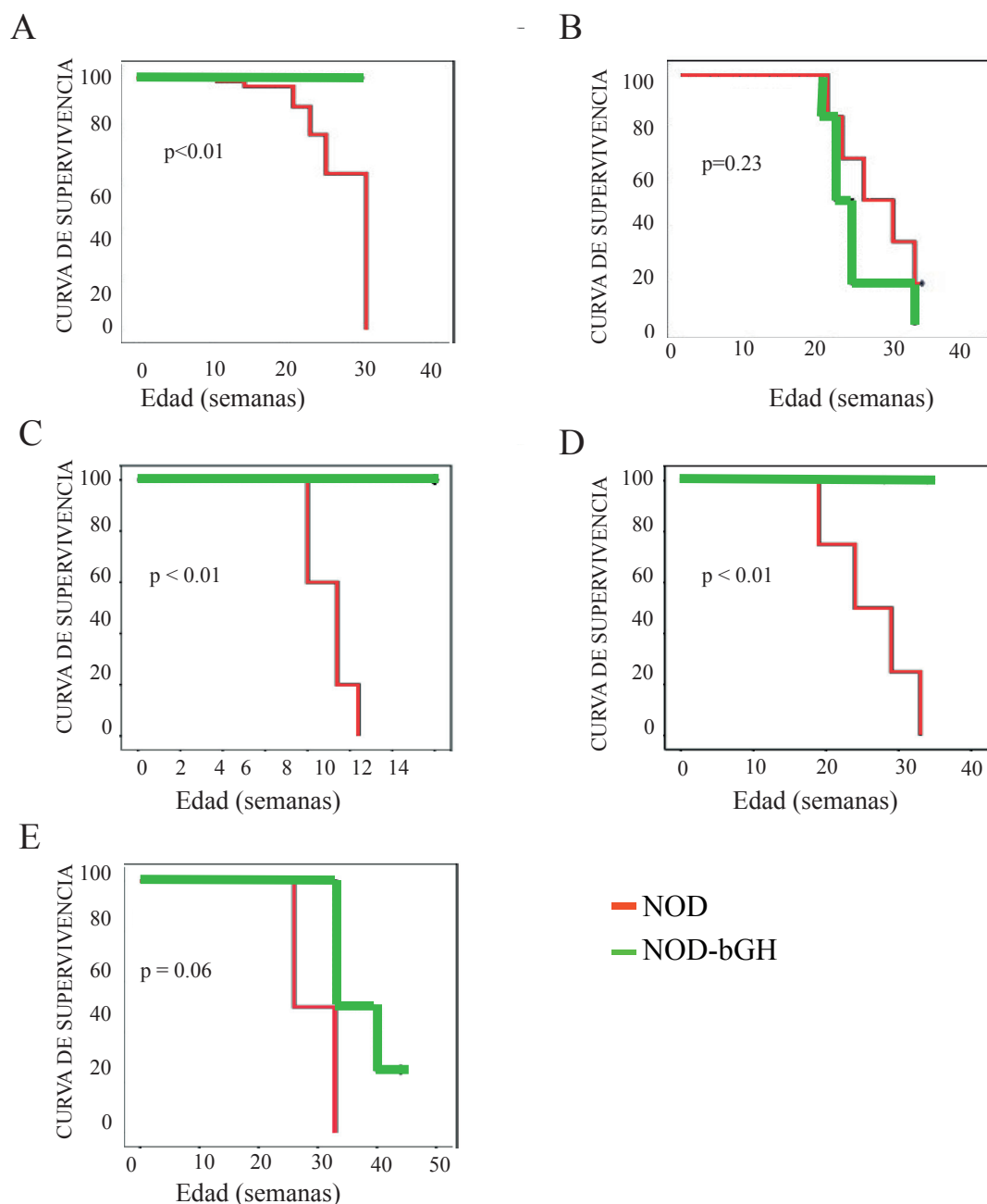


Figura 26- Análisis de Kaplan-Meier en ratones transferidos con esplenocitos. A) Ratones NOD (línea roja, $n = 4$) de 7 semanas de edad fueron inoculados con 2×10^7 esplenocitos del ratón NOD-bGH; como control ratones NOD-bGH (línea verde, $n = 4$) inoculados con los mismos esplenocitos. No se observó retrasos en hiperglicemia al comparar con ratones NOD. B) Ratones NOD (línea roja, $n = 6$) de 7 semanas de edad irradiados subletalmente e inoculados con 2×10^7 esplenocitos del ratón NOD-bGH. No se observaron cambios en el desarrollo de la diabetes comparados con los ratones NOD no inoculados (línea verde) C) Ratones NOD-bGH (línea verde, $n = 5$) de 6 semanas de edad irradiados subletalmente e inoculados con 2×10^7 esplenocitos del ratón NOD. Hermanos de camada NOD (línea roja, $n = 4$) irradiados de igual modo se usaron como control. Se observó un desarrollo acelerado de la diabetes, en los controles de ratones NOD, mientras que los ratones NOD-bGH se mantuvieron resistentes D) Se repitió el experimento C empleando ratones NOD-bGH (línea verde, $n = 4$) irradiados letalmente. Ratones NOD (línea roja, $n = 2$) fueron empleados como control para observar la diabetes acelerada y ratones de ambos tipos irradiados sin inocular (NOD, $n = 2$; NOD-bGH, $n = 2$, no representados) como controles de letalidad; los cuatro ratones sin inocular murieron en la primera semana. E) Ratones NOD/SCID sensibles a desarrollar diabetes después de un trasplante de esplenocitos NOD (línea roja); o de ratones NOD-bGH + NOD, (línea verde); de 12 semanas de edad, ($n = 4$ para ambos grupos); Prueba Log-Rank $p < 0.05$ fueron considerados significativos.

esplenocitos de un grupo de ratones NOD-bGH. Mientras que los que recibieron sólo las células de ratones NOD desarrollaron en 4 semanas la hiperglicemia, los que además recibieron células de los ratones transgénicos presentaron un ligero retraso en la aparición de los síntomas, si bien el retraso no fue estadísticamente significativo (**fig. 26 E**). En conclusión, parece que la presencia de GH circulante es necesaria para desarrollar la protección a la diabetes autoinmune.

4.- Potencial supresor del ratón NOD-bGH

Los mecanismos de tolerancia central (tímica) y periférica son críticos en el control de la respuesta inmune. De hecho, en la diabetes tipo 1, algunos autores asignan a defectos en la tolerancia central el desarrollo de la patología

(Chen, 2005). La expresión de proteínas en el timo bajo la acción del factor de transcripción AIRE juega un papel muy importante para la eliminación de células T autoreactivas en el timo (Chen et al., 2005), entre ellas la propia insulina (Anderson MS et al. 2002). Por otro lado, el factor de transcripción FoxP3 tiene un papel clave en el desarrollo y función de las células T reguladoras, implicadas en el control de la tolerancia (**fig. 27 A-B**). Usando RT-PCR determinamos los niveles de expresión de ambos genes en timo y ganglios linfáticos de ratones NOD, y NOD-bGH de 12 semanas de edad. En contra de lo esperado, no observamos diferencias en los niveles de mRNA de FoxP3 y AIRE en los ratones NOD respecto a los NOD-bGH hermanos de camada.

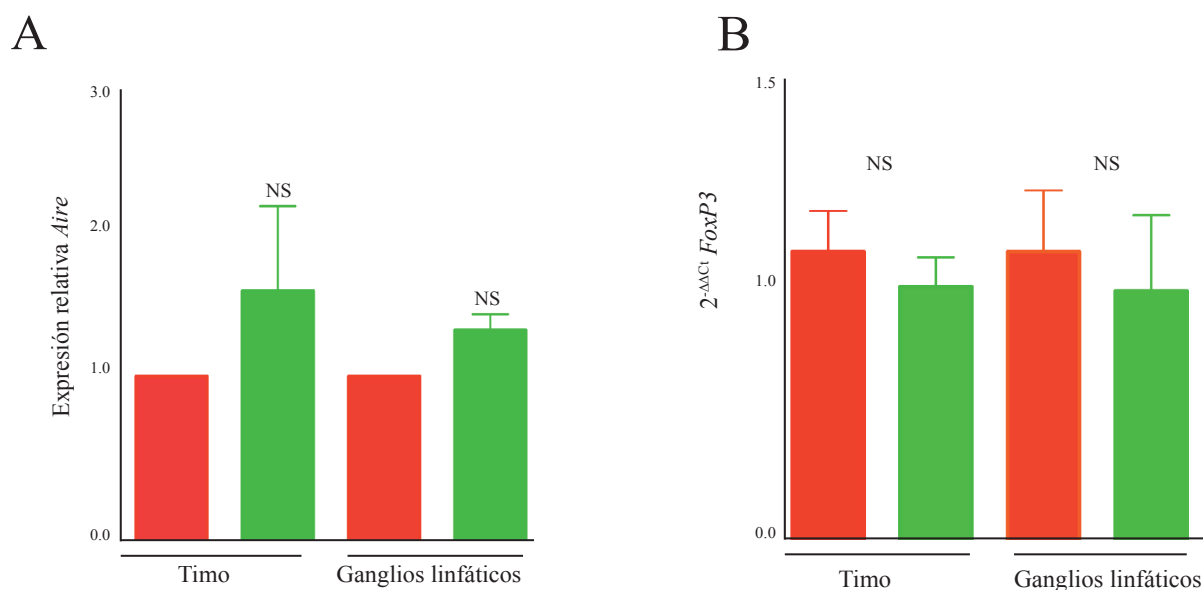


Figura 27.- A) Análisis de expresión de *Aire* por RT-PCR en timo y ganglios periféricos de ratones NOD (barra roja, n=2), y NOD-bGH (barra verde, n=2) de 12 semanas de edad. B) Expresión de FoxP3 de timo y ganglios periféricos de ratones NOD (barra roja, n=2), y NOD-bGH (barra verde, n=2) de 12 semanas de edad. Se analizó la expresión relativa ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) frente beta actina y GAPDH.

Como control se determinaron como referencia los niveles de mRNA para β -actina y GAPDH. A parte la expresión de FoxP3 está directamente ligada a la acción supresora de las células T reguladoras vía STAT5b o STAT3 (Pallandre, 2007). Además, la activación continua de STAT3 es necesaria para la expresión adecuada de FoxP3 (Wang, 2007). Evaluamos pues los niveles de activación de STAT3 y STAT5 en lisados de esplenocitos de ratones NOD y NOD-bGH de 12 semanas de edad, no observando diferencias en la fosforilación de estos factores de transcripción en los

ratones NOD-bGH (**fig. 28**). Probablemente el uso de una mezcla celular en lugar de usar directamente células T reguladoras, que suponen aproximadamente un 12 % de los esplenocitos (**phenome.jax.org**) apantalle la detección de eventuales diferencias.

Las células Treg $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ controlan la progresión de la diabetes a través de varios mecanismos, inhibiendo la activación, la proliferación y/o la migración de células T islote-específicas hacia los ganglios linfáticos y en el páncreas (You et al., 2008). Por otro lado, numerosos estudios relacionan la actividad de

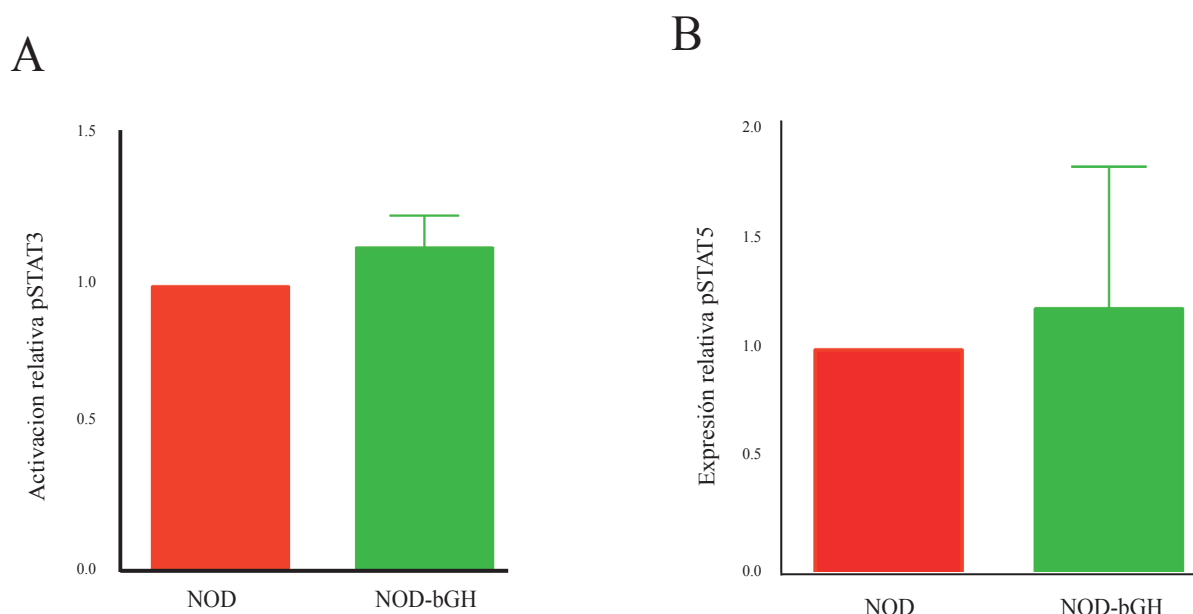


Figura 28.- Expresión de activación de pStat3 y pStat5 de lisados de esplenocitos de ratones NOD y NOD-bGH de 12 semanas de edad. A) Los lisados totales de 2×10^7 esplenocitos de ratones NOD (barra roja, $n=2$), y NOD-bGH (barra verde, $n=2$) fueron analizados por western blot con anticuerpos anti pSTAT 3 y posteriormente con anti-STAT 3. Las bandas fueron densitometradas con el programa ImageJ y su relación definida como activación relativa. B) Activación relativa de anti-pSTAT 5 referida a anti-STAT 5 total en esplenocitos de ratones NOD (barra roja, $n=2$), y NOD-bGH (barra verde, $n=2$) como se lisaron en A. Prueba t Student; NS, no significativa.

las células Treg con en el desarrollo de la diabetes tipo 1, aunque es cierto que su papel durante los estadios prediabéticos no está bien dilucidado (Petzold et al., 2013). Analizamos entonces la expresión de FoxP3 por citometría de flujo en células CD4⁺CD25⁺ de sangre periférica de ratones C57BL/6, NOD, y NOD-bGH, normoglicémicos (8 semanas de edad) (**fig. 29 A**) y una vez que los ratones NOD son hiperglicémicos (20 semanas de edad) (**fig. 29 B**). Mientras que en los ratones de 20 semanas de edad observamos una clara reducción en los niveles de FoxP3 en las células T CD4⁺CD25⁺ de los ratones NOD comparadas con las del ratón C57BL/6, esta reducción no fue significativa en el caso de los ratones NOD-bGH (**fig. 30 A**). Estos resultados sugieren que la GH tiene un efecto sobre el mantenimiento de la actividad de las células reguladoras.

En los ratones de 12 semanas el porcentaje de células CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ fue mayor en C57BL/6 que en NOD o NOD-bGH, sin diferencias entre los dos últimos grupos de ratones. Por otro lado, en los ratones de 20 semanas de edad los ratones NOD-bGH presentaron mayor porcentaje de células CD4⁺FoxP3⁺ que los NOD (**fig. 30 B**). Estos resultados sugieren que la actividad supresora, que disminuye con la edad en los ratones NOD, mantienen sus niveles en los NOD-bGH.

4.1.- Ensayos de supresión *in-vitro*

Para confirmar las observaciones anteriores y comprobar la correlación entre las variaciones en los niveles expresión de FoxP3 en las células CD4⁺CD25⁺ y su capacidad supresora, realizamos un ensayo de supresión

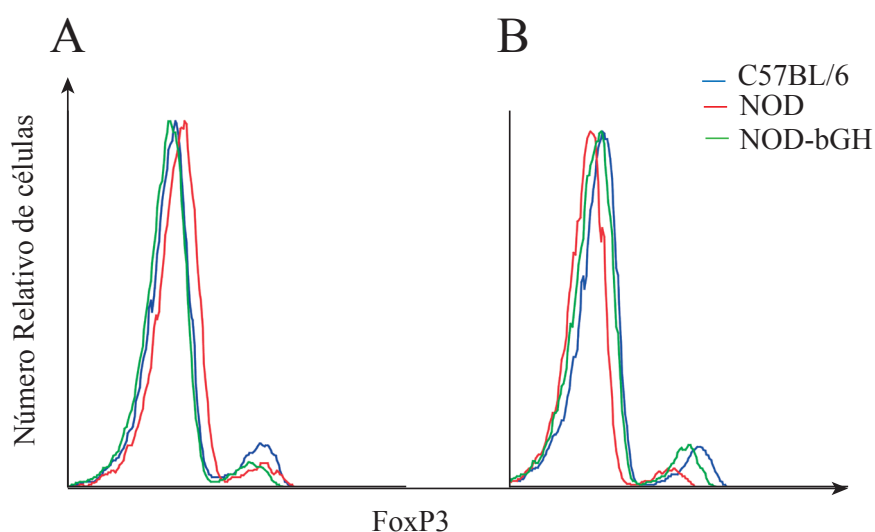


Figura 29.- Análisis de expresión de FoxP3 en células CD4⁺CD25⁺ de sangre periférica de ratones C57BL/6 (línea azul), NOD (línea roja), y NOD-bGH (línea verde) de 8 y 20 semanas de edad.

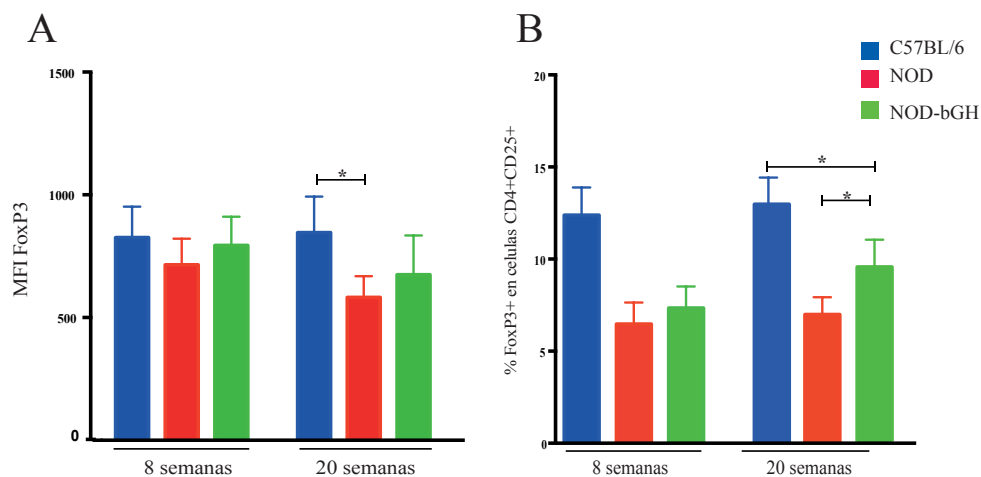


Figura 30.- Análisis de la expresión de FoxP3 en células T reguladoras de sangre periférica en ratones C57BL/6 (azul, n=9), NOD (rojo, n= 9), NOD-bGH (verde, n=9) de 8 y 20 semanas de edad. A) Intensidad media de fluorescencia de FoxP3 en células CD4⁺CD25⁺ de sangre periférica de los tres genotipos B) Porcentaje de células FoxP3 positivas dentro de la subpoblación CD4⁺. Barras: medias \pm SD. Prueba t-Student; *p<0.05.

in vitro. Se co-cultivaron células efectoras CD4⁺CD25⁻ de ratones NOD con proporciones variables (4:1 ó 2:1) de células reguladoras CD4⁺CD25⁺ procedentes del bazo de ratones NOD o de ratones NOD-bGH, de 20 semanas de edad. En el análisis de los datos detectamos

un leve pero significativo aumento de la capacidad supresora por parte de las células del ratón NOD-bGH (**fig. 31**).

Estos resultados apoyan la participación de la GH en el mantenimiento de la potencia supresora de la células Treg, y, probablemente también en mantener mayores niveles de FoxP3

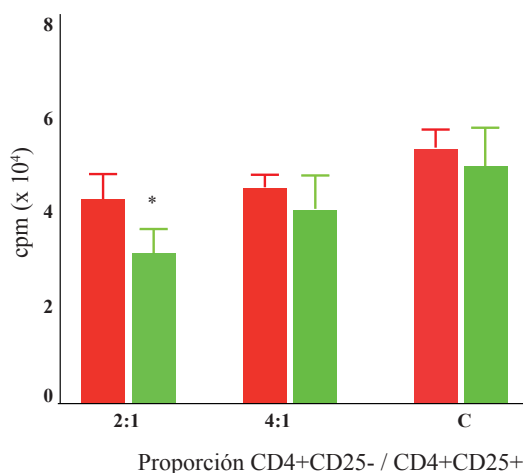


Figura 31.- Ensayo de actividad supresora de células T CD4⁺CD25⁺ de ratones NOD (rojo, n=2) y NOD-bGH (verde, n=2) de 20 semanas de edad a varias proporciones sobre células CD4⁺ CD25⁻ efectoras. Las barras en C corresponden al control sin células supresoras. La medida se realizó determinando la incorporación de timidina ³H. El experimento muestra la media \pm error estandar. Análisis estadístico por prueba t Student: *p<0.05. Se marcaron con el anticuerpo anti-arginasa-1 y contra tinción heamtoxilina. Aumento original 10X.

en las células CD4⁺CD25⁺. Es posible que el efecto se incremente además por la continua exposición de esas células a los altos niveles de GH circulante en los ratones NOD-bGH.

5.- Efecto de la GH en la polarización de los macrófagos

Los macrófagos tienen un papel muy activo en la remodelación pancreática que se produce tras el nacimiento (Charré et al., 2002), y durante la diabetes están presentes en los infiltrados pancreáticos. De hecho son detectados junto al resto de infiltrados linfocitarios tanto en los ratones NOD como en ratones NOD-bGH. La diferencia entre ambos procesos es que, en el desarrollo de la

diabetes tipo 1, los macrófagos sufren una “activación clásica” (M1), que les otorga funciones pro-inflamatorias, a diferencia de los macrófagos con “activación alternativa” (M2), con propiedades antiinflamatorias, que cumplen funciones del control de la inflamación, remodelación de tejidos o sanado de heridas. Los macrófagos M1, entre otros marcadores, se caracterizan por expresar IFN- γ e iNOS2 (inducible nitric oxide synthase); los macrófagos M2 por contra, expresan arginasa-1 (Lumeng et al., 2007). Empleando PCR cuantitativa en tiempo real cuantificamos los niveles de expresión del RNA mensajero para iNOS2, y para arginasa-1 en nódulos pancreáticos de ratones NOD y NOD-bGH, de 12 semanas de edad. Los resultados indican

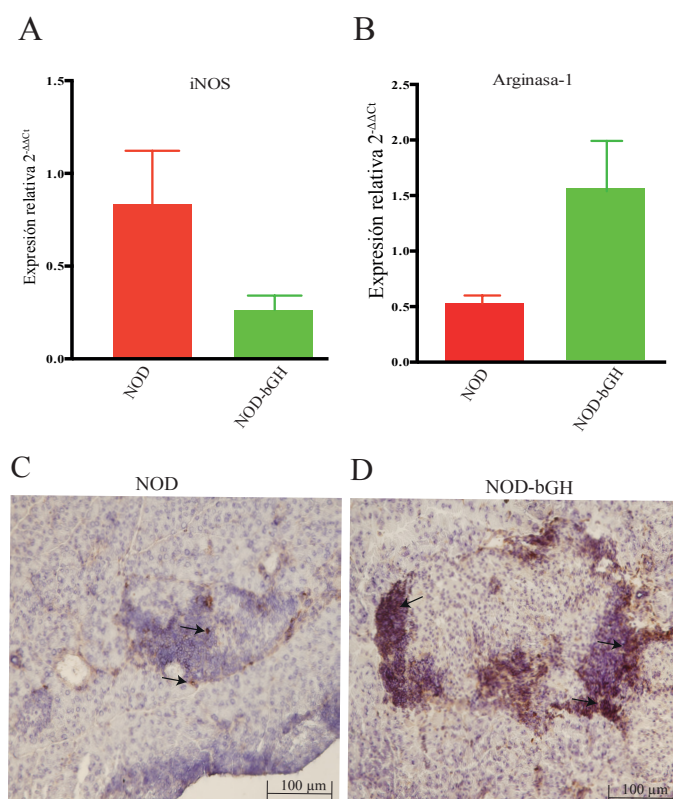


Figura 32.- Expresión de marcadores de macrófagos M1 y M2. A-B) Análisis de qRT-PCR de ganglios pancreáticos de ratones, NOD (rojo, control iNOS, n=2) y NOD-bGH (verde, n=2) de 12 semanas de edad. Los valores ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) son relativos al valor medio de cada mensajero en muestras de ratones NOD. C-D) Inmunohistoquímica de criosecciones de páncreas de ratones NOD y NOD-bGH de 8 semanas de edad, con infiltrados periinsulares. Se marcaron con el anticuerpo anti-arginasa-1 y contra tinción heamtoxilina. Aumento original 10X.

que los niveles de expresión de mRNA para iNOS en los páncreas de los ratones NOD-bGH son menores que en los de ratones NOD, y los niveles de expresión de mRNA de arginasa-1 en el ratón NOD-bGH son más altos en el ratón NOD (**fig. 32 A-B**). Nuestros datos indican por lo tanto que la GH tiene un efecto en la polarización de macrófagos hacia un fenotipo M2. Tinciones inmunohistológicas con anticuerpos anti-arginasa-1 ponen de manifiesto que en los infiltrados pancreáticos de ratones NOD pre-diabéticos, la presencia de macrófagos M2 es sustancialmente menor que en los ratones NOD-bGH (**fig. 32 C-D**), confirmando la conclusión anterior.

6.- GH modula la plasticidad Th17 en el desarrollo de la diabetes

Aunque la diabetes tipo 1 se ha asociado clásicamente a una respuesta Th1, evidencias recientes han localizado en el infiltrado pancreático células Th17 que sin embargo presentan un fenotipo similar al de células Th1, pues expresan el factor de transcripción Tbet y secretan IFN- γ (Lee et al., 2009). En colaboración con el laboratorio de la Dra. Pérez-Gomariz, hemos analizado la plasticidad Th17/Th1 bajo el efecto de la GH, empleando RT-PCR para determinar los niveles de expresión del mRNA de IL-17, IFN- γ , IL-2, IL-22 y GM-CSF en páncreas y bazo de ratones NOD pre-diabéticos y NOD-bGH, de 13 y 20 semanas de edad. También determinamos los niveles de expresión de los factores de transcripción ROR- γ T y Tbet que se reconocen

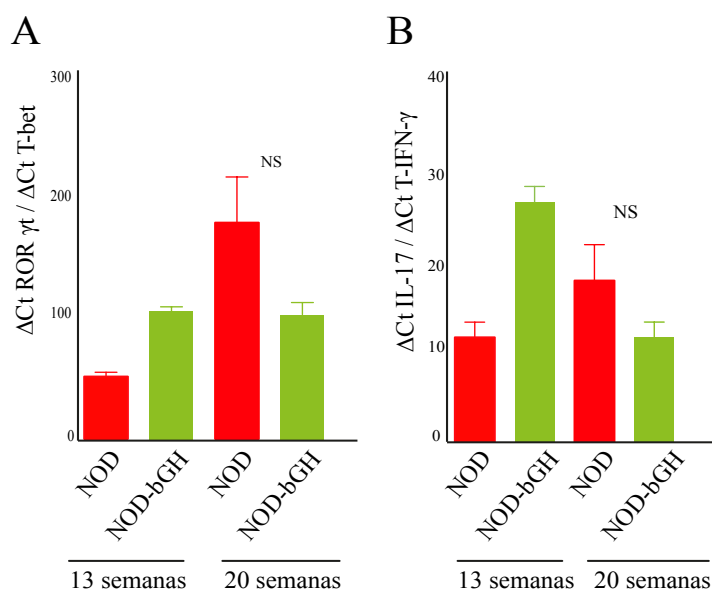


Figura 33.- Ratio de expresión en el páncreas de factores de transcripción específicos de células Th1 y Th17. A) Ratio entre los niveles de expresión de los genes que codifican para los factores de transcripción RORC/Tbx21 y B) Ratio entre los niveles de expresión para los citoquinas IL-17/IFN- γ , en ratones NOD (rojo, n= 6) y NOD-bGH (verde, n= 6). Barras: desviación estándar. Prueba t-Student, *p<0.05; **p<0.01.

como reguladores fundamentales de las respuestas Th17 y Th1 respectivamente. Dado que los infiltrados suponen un porcentaje muy variable del peso total del páncreas, en lugar de comparar los niveles totales de expresión, se optó por utilizar las proporciones entre los niveles de los marcadores correspondientes a las células Th17 y Th1 en cada individuo como indicadores de la abundancia relativa de células Th17 no patogénicas (McGeachy et al., 2007). Al cuantificar los niveles de expresión de RORC que codifica para ROR- γ T y de Tbx21 que codifica para T-bet, (Wicker et al., 1986) los resultados indicaron mayores

proporciones de RORC/Tbx21 (**fig. 33 A**) e IL-17/IFN- γ (**fig. 33 B**) en los páncreas de los ratones NOD-bGH que en los de ratones NOD pre-diabéticos. A las 20 semanas, cuando los islotes están mayoritariamente destruidos en el ratón NOD y los infiltrados se reducen progresivamente, las diferencias dejan de ser significativas. Además, se detectaron niveles absolutos de mRNA para las citoquinas pro-inflamatorias IFN- γ , IL-21, IL-22 y GM-CSF significativamente superiores los páncreas del ratón NOD (**fig. 34**). Estos datos indican una reducción sustancial de la infiltración de células Th17 patogénicas, productoras de IFN- γ , en los páncreas del ratón NOD-bGH.

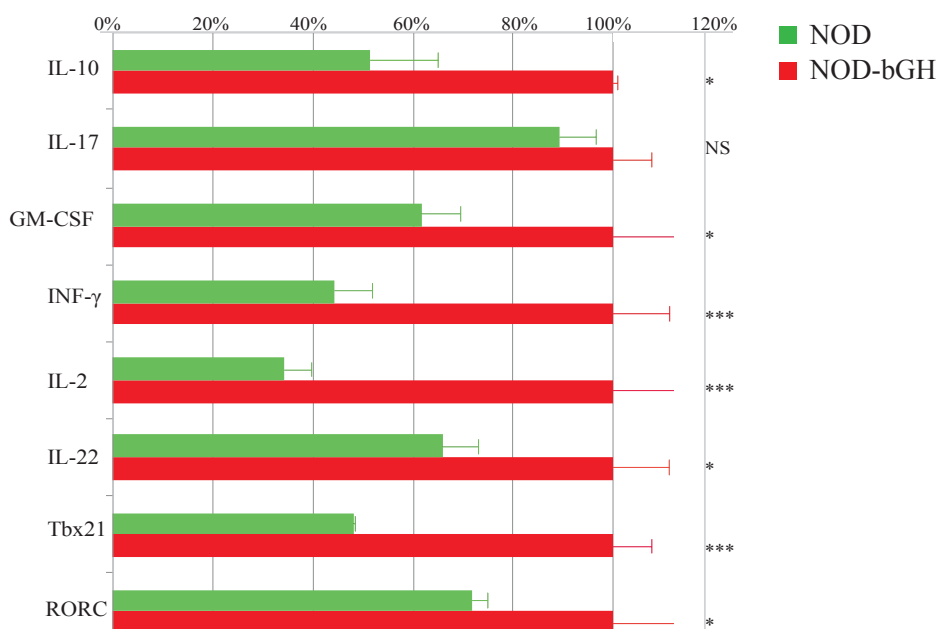


Figura 34.-Expresión relativa ($2^{-\Delta\Delta C_t}$, normalizados frente a los valores de los ratones NOD) de citoquinas por qRT-PCR de mRNA extraído de páncreas NOD (rojo, n=6) y NOD-bGH (verde, n= 6) de 13 semanas de edad. Prueba t-Student; *p<0.05; ***p<0.001.

DISCUSIÓN

Aunque la diabetes tipo 1 puede ocurrir a cualquier edad, es frecuentemente diagnosticada en niños y adolescentes. Se trata de una enfermedad autoinmune en la que las células del sistema inmunológico infiltran el páncreas, invaden los islotes pancreáticos y destruyen las células β , es decir, las células productoras de insulina. Dado que la insulina es necesaria para la que la glucosa sea transportada a las células, donde su metabolización permitirá disponer de la energía necesaria, su falta origina un acúmulo de glucosa en sangre (hiperglucemia) y los consiguientes síntomas patológicos. (Wållberg & Cooke, 2013). Se trata de una patología muy compleja en la que se conjugan factores genéticos y epigenéticos (Calderon, Carrero, Miller, & Unanue, 2011). Algunos polimorfismos en los genes del complejo mayor de histocompatibilidad se han asociado a la probabilidad de desarrollar la enfermedad, apuntando a problemas en la presentación antigénica. Sin embargo, distintas evidencias indican que algunas infecciones virales pueden

desencadenar la respuesta inmune haciendo que macrófagos y células fagocíticas destruyan las células β infectadas y permitan la necesaria presentación de antígenos. De hecho se han detectado anticuerpos contra algunas proteínas presentes en las células β , como por ejemplo la descarboxilasa del ácido glutámico (GAD), con alguna homología con proteínas virales, anticuerpos contra la fosfatasa IA2 y también contra la propia insulina, que muchas veces preceden en años al desarrollo de la patología.

La enfermedad es además inflamatoria, con presencia de células T autoreactivas que tienen un fenotipo Th1 (Lenschow et al., 1996) y en el que también se ha determinado que los procesos de tolerancia y los mecanismos de supresión que controlan la respuesta inmunológica fallan (Postel-Vinay, De Mello Coelho, Gagnerault, & Dardenne, 1997).

Algunas patologías endocrinas que cursan con producción excesiva de hormonas

como epinefrina, glucagón, cortisol u hormona del crecimiento generan diabetes a través de un mecanismo de resistencia a la insulina (diabetes tipo 2) (Yuen, Chong, & Riddle, 2013). La hormona de crecimiento, generada en la hipófisis, ejerce varias funciones en el organismo. Entre ellas, por su conexión con este trabajo, la que afecta al desarrollo del sistema inmunológico. Así, se ha descrito, al estudiar ratones deficientes para GH, que tiene un papel inmuno regulador en la actividad fisiológica del timo (Postel-Vinay et al., 1997), pero también ejerce un efecto sobre la proliferación y actividad de los linfocitos (Murphy, Durum, & Longo, 1992). Sin embargo se conoce muy poco sobre su posible efecto en patologías autoinmunes.

Los ratones de la línea NOD desarrollan espontáneamente diabetes tipo 1. en el presente trabajo se ha introducido en dicha línea un transgen de la bGH para estudiar el efecto de un suministro continuo de hormona sobre la respuesta autoinmune. El ratón generado permite mantener niveles constantes de GH circulante y observar los efectos que se producen sobre el desarrollo de la enfermedad desde el nacimiento hasta edades avanzadas de los ratones.

El fenotipo de ratón obtenido es muy robusto y pone de manifiesto una completa protección al desarrollo de la diabetes tipo 1. Mientras un 85 % las hembras NOD

no transgénicas, hermanas de camada, han desarrollan diabetes alrededor del mes 6, ninguna de las hembras transgénicas la sufre. Nuestros datos sugieren que la presencia de GH suprime casi por completo la respuesta inmune adaptativa: no observamos anticuerpos contra proteínas del islote, expansión de células diabetogénicas, ni destrucción de los islotes. Algunos trabajos ya han recogido efectos de la hormona de crecimiento sobre las células β (Nielsen, Svensson, Galsgaard, Møldrup, & Billestrup, 1999) directos e indirectos a través de su principal mediador IGF-I (Hill, Petrik, Arany, McDonald, & Delovitch, 1999). Efectivamente, trabajos muy antiguos describen un papel en la GH como estimulante de la síntesis de ADN y de la producción de insulina en cultivos de islotes de rata (Whittaker & Taylor, 1980) e incluso teniendo un efecto mitogénico sobre células secretoras de insulina, INS-1 (Rhodes, 2000), o previniendo la apoptosis en los islotes pancreáticos (George et al., 2002). Nuestros datos indican que los ratones NOD-bGH presentan un aumento de la masa de células β que correlaciona con un efecto de la GH, estimulando la proliferación y quizás inhibiendo la apoptosis de las células β .

Además, los resultados derivados de las técnicas de inmunohistoquímica demuestran también la presencia de precursores de los islotes PDX-1⁺, en las paredes ductales del páncreas, sugiriendo un papel de la GH como inductores

de la neogénesis de islotes. Este hecho *per sé* sustenta el efecto protector de la GH sobre el páncreas, y ayuda a explicar también la falta de hiperglicemia en estos ratones. Se sabe que la GH, a través de la ruta JAK/STAT, estimula la supervivencia de las células β y que reguladores negativos de esta ruta como SOCS bloquean el daño pancreático generado por IFN- γ (Flodström-Tullberg et al., 2003). Además, la expresión de STAT5b constitutivamente activo ejerce un efecto protector sobre las células β en un modelo de inducción de apoptosis por estreptozotocina (Jackerott et al., 2006).

Los ratones NOD transgénicos de GH presentan periinsulitis, invasión del tejido pancreático por parte de células del sistema inmune y, sin embargo, como pone de manifiesto la integridad de la capa de células de Schwann, esos infiltrados se mantienen fuera de los islotes y no destruyen las células β . Además, tampoco se detectan en circulación anticuerpos anti-insulina. Estos datos sugieren que la GH también está afectando al sistema inmune. Efectos de la GH sobre los componentes de la respuesta inmune son conocidos desde hace tiempo (Clark, 1997), por ejemplo la hormona afecta a la supervivencia de las células T (Welniak, Sun, & Murphy, 2002). Nosotros no detectamos en estos ratones grandes efectos en ninguna de las poblaciones celulares, como tampoco en los niveles de activación de las células T presentes en los ganglios linfáticos,

a juzgar por los porcentajes de células positivas para CD25, CD69, CD44, y CD62L. Así pueden entenderse también los resultados del ensayo de hipersensibilidad retardada tras inmunizar con esplenocitos alogénicos de ratones C57BL/6. Ambos tipos de ratones respondieron igual, lo que descarta grandes diferencias en la respuesta de las células T.

Se ha argumentado que defectos en las células presentadoras o en la propia presentación antigénica pueden explicar los defectos de tolerización observada en los ratones NOD (Alard et al., 2006). Aunque algunos estudios indican que los ratones transgénicos de GH pueden tener una respuesta inmunológica menor y polarizada a Th2 (Gonzalo et al., 1996), nosotros no hemos detectado esos defectos en el fondo NOD, al menos en cuanto al nivel de citoquinas circulantes. Sin embargo y aunque los niveles de inmunoglobulinas inespecíficas circulantes es normal y también lo es la activación *in vitro* de células B procedentes de NOD y NOD-bGH con anti-IgM, la respuesta frente a antígenos específicos no lo es, ya que los transgénicos de GH muestran una menor respuesta ante la inmunización con ovalbúmina, tanto de IgM como de IgG. Esta observación, junto a la tendencia de la GH a favorecer la presencia de IgG2 frente a IgG1, (Gonzalo et al., 1996), sugieren que la GH afecta a la presentación antigénica y también altera la función de las células T.

Este hecho quedo también demostrado al observar que en los ensayos de diabetes acelerada el trasplante de esplenocitos del ratón NOD-bGH al ratón NOD no protegió de la diabetes, y que esplenocitos de ratón NOD trasplantados en ratones NOD-bGH no promovieron el desarrollo de la diabetes.

En la diabetes tipo 1 se ha detectado también un defecto en la capacidad supresora de las células T reguladoras, y que la actividad de estas células está definida por los niveles de expresión de su factor de transcripción FoxP3 (Manirarora et al, 2008). De hecho mutaciones del gen FoxP3 están relacionadas con las desregulación de la actividad supresora de las Treg, y se ha observado una disminución de células CD4⁺CD25⁺ en los ratones NOD (Josefowicz, Lu, & Rudensky, 2012). Nosotros no hemos detectado por RT-PCR que los niveles de expresión de FoxP3 en timo y ganglios periféricos de ratones NOD-bGH de 12 semanas de edad está aumentado con respecto al ratón NOD. Por el contrario, sí detectamos por citometría de flujo en ratones de 20 semanas de edad que tanto la expresión de Foxp3 como el número de células CD4⁺CD25⁺ es mayor en el ratón NOD-bGH. Es por lo tanto posible que la GH regule la expresión de FoxP3. Aunque STAT5 es la proteína STAT activada predominantemente por GH, STAT1 y STAT3 también se activan a través del receptor de GH (Campbell G S, Pang L, et al., 1995) y la activación sostenida en el

tiempo de STAT3 es necesaria para mantener la expresión de FoxP3 por las células T (Wang et. al. 2007).

En los ensayos de transferencia adoptiva observamos que los ratones NOD-bGH irradiados letal y subletalmente quedaban protegidos por la expresión de GH. La hormona de crecimiento promueve una radioprotección en varios tipos celulares que difiere según el nicho celular evaluado. Por ejemplo, GH y su principal mediador, IGF-I, aumentan la radioprotección y la proliferación de células madre hematopoyéticas (Chen et al., 2010). Sin embargo, estos mecanismos de resistencia no parecen ser suficientes para mantener la expansión rápida de las células supresoras que deberían controlar la enfermedad en estos modelos de diabetes acelerada. Es probable que la GH aumente la radioprotección en las células T reguladoras en nuestro modelo NOD-bGH. De hecho, se ha demostrado que la transferencia de células de médula ósea de ratones *scurfy*, deficientes para FoxP3, hacia un ratón recipiente silvestre irradiado letalmente impide el desarrollo de la autoinmunidad. El mecanismo implica la supresión de las células T derivadas del ratón donante por células reguladoras FoxP3⁺ radioresistentes (Komatsu & Hori, 2007).

Nosotros evaluamos en ensayos *in-vitro* la capacidad supresora de las células Treg

de ratones NOD y NOD-bGH y encontramos diferencias que, aunque pequeñas, alcanzaron la significatividad estadística. Estas diferencias seguramente no serían suficientes para explicar la resistencia completa al desarrollo de la diabetes de los ratones, sin embargo la diferenciación de células T y su actividad son dependientes de las células presentadoras de antígenos, y del microambiente en donde la presentación ocurre. Las células T CD4⁺ pueden estar siendo inducidas por macrófagos tipo M2 en el páncreas para presentar un fenotipo supresor (Savage et al., 2008). Es conocido que los macrófagos se pueden definir como inflamatorios o M1, que tienen funciones pro-inflamatorias, participando también en la presentación antigénica, y macrófagos no inflamatorios o M2, con propiedades antiinflamatorias, que además de controlar la inflamación participan también en procesos de remodelación o reparación de tejidos. Los macrófagos M1 son inducidos por IFN- γ y se caracterizan por expresar iNOS2 (inducible nitric oxide synthase) y producir IL-1 e IL-12. Los macrófagos M2, por el contrario, se inducen por IL-4 e IL-13, expresan arginasa-1 y secretan IL-10 (Lumeng, et al, 2007). La presencia pues en el microambiente celular de citoquinas del tipo IFN- γ , IL-4, IL-17 tienen un papel crucial para la diferenciación de los macrófagos (Zizzo & Cohen, 2013). Nuestros datos obtenidos en ganglios linfáticos y páncreas indican una mayor expresión de marcadores de macrófagos

M2 en los ratones NOD-bGH mientras en los NOD son M1. La diferencia puede ser consecuencia de los altos niveles de IL-17 circulante en los ratones NOD-bGH y a la vez influir también en la actividad de células reguladoras a nivel local.

La diabetes tipo 1 es una patología Th1 (Azar et al., 1999). De hecho, nosotros detectamos expresión de mRNA para IFN- γ e IL-2 en el páncreas de los ratones NOD, siendo en los NOD-bGH significativamente menores. Curiosamente en ambos tipos de ratones encontramos también altos niveles de mRNA para IL-17 e incluso de mRNA para el factor de transcripción, ROR- γ T que caracteriza las células Th17.

Las células Th17 se han asociado a muchas patologías autoinmunes. Por ejemplo son críticas en las esclerosis múltiple (Komiyama et al., 2006). Es cierto, sin embargo, que en determinadas circunstancias y en función del microambiente que rodea a las células, las células Th17 alteran su diferenciación para ejercer alternativamente funciones protectoras o proinflamatorias (Ghoreschi et al., 2012; Marwaha, Leung, McMurchy, & Levings, 2012). De hecho, en ratones NOD-bGH los niveles de mRNA para IFN- γ , IL-2 y GM-CSF son menores que en los ratones NOD, lo que es asimilable a un fenotipo Th17 menos patogénico en aquellos ratones, mientras

en los ratones NOD las células Th17 con un fenotipo Th1 ejercen un efecto amplificador de la enfermedad. Cómo la GH ejerce esa función es hoy desconocido, pero abre la posibilidad a una nueva vía de investigación.

El fenotipo observado en el desarrollo de este proyecto con efecto de la GH sobre las células β , las células de Schwann que

rodean el islote, la presentación antigénica, las células T efectoras, las células reguladoras, la polarización de macrófagos y las células Th17, resaltan la importancia del control hormonal en la respuesta inmune e indican que la hormona de crecimiento o sus análogos pueden ser importantes dianas terapéuticas en la autoinmunidad.

CONCLUSIONES

1. El ratón NOD que expresa constitutivamente el transgen para la hormona de crecimiento muestra resistencia al desarrollo de la diabetes tipo 1.
2. El estudio histológico del páncreas de estos ratones demuestra un mayor crecimiento de los islotes e infiltración celular del páncreas (periinsulitis) que sin embargo no alcanza el interior de los islotes .
3. La hormona de crecimiento incrementa la proliferación y posiblemente reduce la apoptosis de las células β pancreáticas.
4. La hormona de crecimiento tiene un efecto inhibitorio sobre la respuesta autoinmune detectándose una falta de células efectoras diabetogénicas y auto-anticuerpos.
5. Aunque los ratones transgénicos de hormona de crecimiento presentan una menor producción de anticuerpos específicos de antígenos, la hormona de crecimiento no afecta la activación de las células B, sugiriendo una presentación antigénica alterada.
6. La hormona de crecimiento favorece el mantenimiento de la capacidad supresora de las células T reguladoras, determinado por el análisis de los niveles de FoxP3 y los ensayos de supresión *in vitro*.
7. La hormona de crecimiento regula la plasticidad de las células Th17. La diabetes tipo 1 se ha asociado a la presencia de células Th17 productoras de IFN- γ en el páncreas. La hormona de crecimiento circulante regula la diferenciación de estas células Th17 estimulando la producción de IL-4 e IL-17.
8. La hormona de crecimiento modula la polarización de los macrófagos infiltrantes, favoreciendo la presencia de macrófagos M2 o antiinflamatorios.

BIBLIOGRAFÍA

- Abbas, A.K. & Lichtman, A.H., 2010. *Cellular and Molecular Immunology* Fifth edit., San Francisco: Saunders.
- Agardh, C.-D. et al., 2005. Clinical evidence for the safety of GAD65 immunomodulation in adult-onset autoimmune diabetes. *Journal of diabetes and its complications*, 19(4), pp.238–46.
- Alard, P. et al., 2006. Deficiency in NOD antigen-presenting cell function may be responsible for suboptimal CD4+CD25+ T-cell-mediated regulation and type 1 diabetes development in NOD mice. *Diabetes*, 55(7), pp.2098–105.
- Anderson, M.S. & Bluestone, J. a, 2005. The NOD mouse: a model of immune dysregulation. *Annual review of immunology*, 23, pp.447–85.
- Von Andrian, U.H. & Mackay, C.R., 2000. T-Cell Function and Migration — Two Sides of the Same Coin. *New England Journal of Medicine*, 343(14), pp.1020–1034.
- Aoki, C. a et al., 2005. NOD mice and autoimmunity. *Autoimmunity reviews*, 4(6), pp.373–9.
- Arreaza, G. et al., 2003. Deficient activation and resistance to activation-induced apoptosis of cd8+ t cells is associated with defective peripheral tolerance in nonobese diabetic mice. *Clinical Immunology*, 107(2), pp.103–115.
- Arstila, T.P., 1999. A Direct Estimate of the Human T Cell Receptor Diversity. *Science*, 286(5441), pp.958–961.
- Azar, S.T. et al., 1999. Type I (Insulin-Dependent) Diabetes Is a Th1- and Th2-Mediated Autoimmune Disease Type I (Insulin-Dependent) Diabetes Is a Th1- and Th2-Mediated Autoimmune Disease. *Clinical and Vaccine Immunology*, 6(3), pp.2–7.
- Van Belle, T.L., Coppieters, K.T. & von Herrath, M.G., 2011. Type 1 diabetes: etiology, immunology, and therapeutic strategies. *Physiological reviews*, 91(1), pp.79–118.
- Bonner-Weir, S. et al., 2010. Beta-cell growth and regeneration: replication is only part of the story. *Diabetes*, 59(10), pp.2340–8.
- Bouwens, L. & Rومان, I., 2005. Regulation of pancreatic beta-cell mass. *Physiological reviews*, 85(4), pp.1255–70.
- Brelje, T.C. et al., 2004. Distinctive roles for prolactin and growth hormone in the activation of signal transducer and activator of transcription 5 in pancreatic islets of langerhans. *Endocrinology*, 145(9), pp.4162–75.
- Brode, S. et al., 2006. Cyclophosphamide-Induced Type-1 Diabetes in the NOD Mouse Is Associated with a Reduction of CD4+CD25+Foxp3+ Regulatory T Cells. *The Journal of Immunology*, 177, pp.6603–6612.
- Broere, F. et al., 2011. T cell subsets and t cell-mediated immunity. *Principles of Immunopharmacology*, pp.15–28.
- Buckner, J.H., 2010. Mechanisms of impaired regulation by CD4(+)CD25(+) FOXP3(+) regulatory T cells in human autoimmune diseases. *Nature reviews. Immunology*, 10(12), pp.849–59.
- Calderon, B. et al., 2011. Cellular and molecular events in the localization of diabetogenic T cells to islets of Langerhans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(4), pp.1561–6.

- Calderon, B., Suri, A. & Unanue, E.R., 2006. In CD4⁺ T-cell-induced diabetes, macrophages are the final effector cells that mediate islet beta-cell killing: studies from an acute model. *The American journal of pathology*, 169(6), pp.2137–47.
- Campbell, G S., Pang, L., et al., 1995. STAT5 Activity in Pancreatic B-cells *J Biol Chem*, 270, pp.3974–3979.
- Charré, S. et al., 2002. Abnormalities in dendritic cell and macrophage accumulation in the pancreas of nonobese diabetic (NOD) mice during the early neonatal period. *Histology and histopathology*, 17(2), pp.393–401.
- Chen, B.J. et al., 2010. Growth hormone mitigates against lethal irradiation and enhances hematologic and immune recovery in mice and nonhuman primates. *PloS one*, 5(6), p.e11056.
- Chen, Z., Benoist, C. & Mathis, D., 2005. How defects in central tolerance impinge on a deficiency in regulatory T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(41), pp.14735–14740.
- Christ, E.R. et al., 2003. The effect of growth hormone (GH) replacement therapy in adult patients with type 1 diabetes mellitus and GH deficiency. *Clinical Endocrinology*, 58(3), pp.309–315.
- Clark, R., 1997. The Somatogenic Hormones and Insulin-Like Growth Factor-1: Stimulators of Lymphopoiesis and Immune Function. *Endocrine Reviews*, 18(2), pp.157–179.
- Cohn, L. et al., 1999. Th2-induced airway mucus production is dependent on IL-4R α , but not on eosinophils. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 162(10), pp.6178–83.
- Crawford, F. et al., 2011. Specificity and detection of insulin-reactive CD4⁺ T cells in type 1 diabetes in the nonobese diabetic (NOD) mouse. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(40), pp.16729–34.
- Cucca, F. et al., 2001. A correlation between the relative predisposition of MHC class II alleles to type 1 diabetes and the structure of their proteins. *Human Molecular Genetics*, 10(19), pp.2025–2038.
- Elmore, S., 2007. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic pathology*, 35(4), pp.495–516.
- Emamaullee, J. a et al., 2009. Inhibition of Th17 cells regulates autoimmune diabetes in NOD mice. *Diabetes*, 58(6), pp.1302–11.
- Esquifino, a I. et al., 2002. Effects of overexpression of growth hormone on T cell activity in transgenic mice. *Journal of physiology and biochemistry*, 58(3), pp.161–168.
- Fairweather, D. & Cihakova, D., 2009. Alternatively activated macrophages in infection and autoimmunity. *Journal of autoimmunity*, 33(3-4), pp.222–30.
- Faveeuw, C., Gagnerault, M.-C. & Lepault, F., 1995. Isolation of leukocytes infiltrating the islets of Langerhans of diabetes-prone mice for flow cytometric analysis. *Journal of Immunological Methods*, 184(1), pp.163–169.
- Ferraro, A. et al., 2011. Expansion of Th17 cells and functional defects in T regulatory cells are key features of the pancreatic lymph nodes in patients with type 1 diabetes. *Diabetes*, 60(11), pp.2903–13.
- Ferreira, C. et al., 2009. Non-obese diabetic mice select a low-diversity repertoire of natural regulatory T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(20), pp.8320–8325.
- Flodström-Tullberg, M. et al., 2003. Target cell expression of suppressor of cytokine signaling-1 prevents diabetes in the NOD mouse. *Diabetes*, 52(11), pp.2696–700.
- Galdiero, M.R. et al., 2013. Tumor associated macrophages and neutrophils in tumor progression. *Journal of cellular physiology*, 228(7), pp.1404–12.
- George, M. et al., 2002. Beta cell expression of IGF-I leads to recovery from type 1 diabetes. *The Journal of clinical investigation*, 109(9), pp.1153–63.
- Ghoreschi, K. et al., 2012. Thelper 17 cell heterogeneity and pathogenicity in autoimmune disease. *Trends in immunology*, 32(9), pp.395–401.

- Gonzalo, J. a et al., 1996. Enterotoxin septic shock protection and deficient T helper 2 cytokine production in growth hormone transgenic mice. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 157(8), pp.3298–304.
- Gupta, S. & Louis, A.G., 2013. Tolerance and autoimmunity in primary immunodeficiency disease: a comprehensive review. *Clinical reviews in allergy & immunology*, 45(2), pp.162–9.
- Hall, M.A. et al., 2002. Humoral Immune Response in Mice Over-expressing or Deficient in Growth Hormone. *Experimental Biology and Medicine*, 227, pp.535–544.
- Hampe, C.S., 2012. B Cells in Autoimmune Diseases. *Scientifica*, 2012.
- Han, G. et al., 2010. Interleukin-17-producing gammadelta+ T cells protect NOD mice from type 1 diabetes through a mechanism involving transforming growth factor-beta. *Immunology*, 129(2), pp.197–206.
- Heinzel, F.P. et al., 1989. Reciprocal expression of interferon gamma or interleukin 4 during the resolution or progression of murine leishmaniasis. Evidence for expansion of distinct helper T cell subsets. *The Journal of experimental medicine*, 169(1), pp.59–72.
- Hertzog, P., Forster, S. & Samarajiwa, S., 2011. Systems biology of interferon responses. *Journal of interferon & cytokine research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research*, 31(1), pp.5–11.
- Hill, D.J. et al., 1999. Insulin-like growth factors prevent cytokine-mediated cell death in isolated islets of Langerhans from pre-diabetic non-obese diabetic mice. *The Journal of endocrinology*, 161(1), pp.153–65.
- Hogquist, K.A., Baldwin, T.A. & Jameson, S.C., 2005. Central tolerance: learning self-control in the thymus. *Nature reviews. Immunology*, 5(10), pp.772–82.
- Homo-Delarche, F. & Drexhage, H. a, 2004. Immune cells, pancreas development, regeneration and type 1 diabetes. *Trends in immunology*, 25(5), pp.222–9.
- Horwitz, D. a, Zheng, S.G. & Gray, J.D., 2008. Natural and TGF-beta-induced Foxp3(+) CD4(+) CD25(+) regulatory T cells are not mirror images of each other. *Trends in immunology*, 29(9), pp.429–35.
- <http://phenome.jax.org>
- Jackerott, M. et al., 2006. STAT5 activity in pancreatic beta-cells influences the severity of diabetes in animal models of type 1 and 2 diabetes. *Diabetes*, 55(10), pp.2705–12.
- Jensen, J. et al., 2005. STAT5 activation by human GH protects insulin-producing cells against interleukin-1beta, interferon-gamma and tumournecrosisfactor-alpha-induced apoptosis independent of nitric oxide production. *The Journal of endocrinology*, 187(1), pp.25–36.
- Jørgensen, M.C. et al., 2007. An illustrated review of early pancreas development in the mouse. *Endocrine reviews*, 28(6), pp.685–705.
- Josefowicz, S.Z., Lu, L.F. & Rudensky, a Y., 2012. Regulatory T cells: Mechanisms of differentiation and function. *Annual Review of Immunology*, 30, pp.531–564.
- Jun, H.S. et al., 1999. The role of macrophages in T cell-mediated autoimmune diabetes in nonobese diabetic mice. *The Journal of experimental medicine*, 189(2), pp.347–58.
- Kawamoto, M. et al., 2006. Expression and function of inducible co-stimulator in patients with systemic lupus erythematosus: possible involvement in excessive interferon-gamma and anti-double-stranded DNA antibody production. *Arthritis research & therapy*, 8(3), p.R62.
- King, C., Tangye, S.G. & Mackay, C.R., 2008. T follicular helper (TFH) cells in normal and dysregulated immune responses. *Annual review of immunology*, 26, pp.741–66.
- Kishimoto, H. & Sprent, J., 2001. A defect in central tolerance in NOD mice. *Nature immunology*, 2(11), pp.1025–31.
- Komatsu, N. & Hori, S., 2007. Full restoration of peripheral Foxp3+ regulatory T cell pool by radioresistant host cells in scurfy bone marrow chimeras. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(21), pp.8959–64.

- Komiyama, Y. et al., 2006. IL-17 plays an important role in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 177(1), pp.566–73.
- Kopchick, J. J., Bellush, L. L., & Coschigano, K. T. (1999). Transgenic models of growth hormone action. *Annual review of nutrition*, 19, 437–61.
- Lee, J.-Y. et al., 2007. The transcription factors Stat5a/b are not required for islet development but modulate pancreatic beta-cell physiology upon aging. *Biochimica et biophysica acta*, 1773(9), pp.1455–61.
- Lee, Y.K. et al., 2009. Developmental plasticity of Th17 and Treg cells. *Current opinion in immunology*, 21(3), pp.274–80.
- Lehuen, A. et al., 2010. Immune cell cross-talk in type 1 diabetes. *Nature reviews. Immunology*, 10(7), pp.501–13.
- Lennon, G.P. et al., 2009. T cell islet accumulation in type 1 diabetes is a tightly regulated, cell-autonomous event. *Immunity*, 31(4), pp.643–53.
- Lenschow, D.J. et al., 1996. CD28/B7 Regulation of Th1 and Th2 Subsets in the Development of Autoimmune Diabetes. *Immunity*, 5(3), pp.285–293.
- Lin, M.S. et al., 2011. A multivalent vaccine for type 1 diabetes skews T cell subsets to Th2 phenotype in NOD mice. *Immunologic research*, 50(2-3), pp.213–20.
- Liu, X. et al., 2012. Bcl6 expression specifies the T follicular helper cell program in vivo. *The Journal of experimental medicine*, 209(10), pp.1841–52, S1–24.
- Lochner, M. et al., 2008. In vivo equilibrium of proinflammatory IL-17+ and regulatory IL-10+ Foxp3+ RORgamma t+ T cells. *The Journal of experimental medicine*, 205(6), pp.1381–93.
- Long, E.O. et al., 2013. Controlling natural killer cell responses: integration of signals for activation and inhibition. *Annual review of immunology*, 31, pp.227–58.
- Lumeng, C.N., Bodzin, J.L. & Saltiel, A.R., 2007. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *The Journal of clinical investigation*, 117(1), pp.175–84.
- Lu, Y., Herrera, P. L., Guo, Y., Sun, D., Tang, Z., LeRoith, D., & Liu, J.-L. (2004). Pancreatic-Specific Inactivation of IGF-I Gene Causes Enlarged Pancreatic Islets and Significant Resistance to Diabetes. *Diabetes*, 53(12).
- Maggi, E. et al., 2005. Thymic regulatory T cells. *Autoimmunity reviews*, 4(8), pp.579–86.
- Makino, S. et al., 1980. Breeding of a non-obese, diabetic strain of mice. *Experimental animals*, 29(1), pp.1–13.
- Manirarora, J.N. et al., 2008. APC activation restores functional CD4(+)CD25(+) regulatory T cells in NOD mice that can prevent diabetes development. D. Unutmaz, ed. *PloSone*, 3(11), p.e3739.
- Markle, J.G.M. et al., 2013. $\gamma\delta$ T Cells Are Essential Effectors of Type 1 Diabetes in the Nonobese Diabetic Mouse Model. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 190(11), pp.5392–401.
- Marwaha, A.K. et al., 2012. TH17 Cells in Autoimmunity and Immunodeficiency: Protective or Pathogenic? *Frontiers in immunology*, 3(June), p.129.
- Mathis, D., Vence, L. & Benoist, C., 2001. Beta-Cell death during progression to diabetes. *Nature*, 414(6865), pp.792–8.
- Mauri, C. & Bosma, A., 2012. Immune regulatory function of B cells. *Annual review of immunology*, 30, pp.221–41.
- McGeachy, M.J. et al., 2007. TGF-beta and IL-6 drive the production of IL-17 and IL-10 by T cells and restrain T(H)-17 cell-mediated pathology. *Nature immunology*, 8(12), pp.1390–7.
- McGrane, M. M., Yun, J. S., Moorman, A. F., Lamers, W. H., Hendrick, G. K., Arafah, B. M., Hanson, R. W. (1990). Metabolic effects of developmental, tissue, and cell-specific expression of a chimeric phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP)/bovine growth hormone gene in transgenic mice. *The Journal of biological chemistry*, 265(36), 22371–9.
- Melanitou, E., 2005. The autoimmune contrivance: genetics in the mouse model. *Clinical immunology (Orlando, Fla.)*, 117(3), pp.195–206.

- Mellado, M. et al., 1998. HIV-1 envelope protein gp120 triggers a Th2 response in mice that shifts to Th1 in the presence of human growth hormone. *Vaccine*, 16(11-12), pp.1111–1115.
- Merad, M. et al., 2013. The dendritic cell lineage: ontogeny and function of dendritic cells and their subsets in the steady state and the inflamed setting. *Annual review of immunology*, 31, pp.563–604.
- Mondino, A., Khoruts, A. & Jenkins, M.K., 1996. The anatomy of T-cell activation and tolerance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(6), pp.2245–52.
- Murphy, W.J., Durum, S.K. & Longo, D.L., 1992. Role of neuroendocrine hormones in murine T cell development. Growth hormone exerts thymopoietic effects in vivo. *Journal of immunology*, 149(12), pp.3851–7.
- Nakayama, M. et al., 2005. Prime role for an insulin epitope in the development of type 1 diabetes in NOD mice. *Nature*, 435(7039), pp.220–3.
- Nielsen, J.H. et al., 1999. Beta cell proliferation and growth factors. *Journal of molecular medicine Berlin Germany*, 77(1), pp.62–66.
- Nurieva, R.I. et al., 2009. Bcl6 mediates the development of T follicular helper cells. *Science (New York, N.Y.)*, 325(5943), pp.1001–5.
- Ogasawara, K. et al., 2003. Impairment of NK Cell Function by NKG2D Modulation in NOD Mice. *Immunity*, 18(1), pp.41–51.
- Paris, M. et al., 2004. Review: pancreatic beta-cell neogenesis revisited. *Experimental diabetes research*, 5(2), pp.111–21.
- Peng, H. & Hagopian, W., 2006. Environmental factors in the development of Type 1 diabetes. *Reviews in endocrine & metabolic disorders*, 7(3), pp.149–62.
- Petzold, C. et al., 2013. Foxp3(+) regulatory T cells in mouse models of type 1 diabetes. *Journal of diabetes research*, 2013, p.940710.
- Postel-Vinay, M.C. et al., 1997. Growth hormone stimulates the proliferation of activated mouse T lymphocytes. *Endocrinology*, 138(5), pp.1816–1820.
- Rhodes, C.J., 2000. IGF-I and GH post-receptor signaling mechanisms for pancreatic beta-cell replication. *Journal of molecular endocrinology*, 24(3), pp.303–11.
- Rissoan, M., 1999. Reciprocal Control of T Helper Cell and Dendritic Cell Differentiation. *Science*, 283(5405), pp.1183–1186.
- Rooman, I. et al., 2000. Modulation of rat pancreatic acinoductal transdifferentiation and expression of PDX-1 *in vitro*. *Diabetologia*, 43(7), pp.907–14.
- Sarma, J.V. & Ward, P.A., 2011. The complement system. *Cell and tissue research*, 343(1), pp.227–35.
- Sato, T. & Herman, L., 1981. Stereological Analysis of Normal Rabbit Pancreatic Islets. *The american journal of anatomy*, 84, pp.71–84.
- Savage, N.D.L. et al., 2008. Human anti-inflammatory macrophages induce Foxp3+ GITR+ CD25+ regulatory T cells, which suppress via membrane-bound TGFbeta-1. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 181(3), pp.2220–6.
- Savino, W. et al., 2012. Growth hormone modulates migration of thymocytes and peripheral T cells. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1261, pp.49–54.
- Savino, W. & Dardenne, M., 2000. Neuroendocrine Control of Thymus Physiology. *Endocrine Reviews*, 21(4), pp.412–443.
- Scholzen, T. & Gerdes, J., 2000. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *Journal of cellular physiology*, 182(3), pp.311–22.
- Schumacher, T.N.M., Gerlach, C. & van Heijst, J.W.J., 2010. Mapping the life histories of T cells. *Nature reviews. Immunology*, 10(9), pp.621–31.
- Seder, R.A. et al., 1993. Interleukin 12 acts directly on CD4+ T cells to enhance priming for interferon gamma production and diminishes interleukin 4 inhibition of such priming. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(21), pp.10188–92.
- Shao, S. et al., 2012. Th17 cells in type 1 diabetes. *Cellular immunology*, 280(1), pp.16–21.

- Smith-Garvin, J.E., Koretzky, G. a & Jordan, M.S., 2009. T cell activation. *Ann rev immunol*, 27, pp.591–619.
- Solinas, G. et al., 2009. Tumor-associated macrophages (TAM) as major players of the cancer-related inflammation. *Journal of leukocyte biology*, 86(5), pp.1065–73.
- Soundarapandian, M.M. et al., 2010. Genetic Control of β -Cell Mass Homeostasis. *The open endocrinology Journal*, 4, pp.11–24.
- Sreenan, S. et al., 1999. Increased Beta-Cell Proliferation and Reduced Mass Before Diabetes Onset in the Nonobese Diabetic Mouse. *Diabetes*, 48, pp.989–996.
- Stiller, C.R. et al., 1987. Effects of cyclosporine in recent-onset juvenile type 1 diabetes: impact of age and duration of disease. *The Journal of pediatrics*, 111(6 Pt 2), pp.1069–72.
- Sutton, C.E., Mielke, L.A. & Mills, K.H.G., 2012. IL-17-producing $\gamma\delta$ T cells and innate lymphoid cells. *European journal of immunology*, 42(9), pp.2221–31.
- Szabat, M. et al., 2012. Maintenance of β -cell maturity and plasticity in the adult pancreas: developmental biology concepts in adult physiology. *Diabetes*, 61(6), pp.1365–71.
- Tang, Q. et al., 2008. Central role of defective interleukin-2 production in the triggering of islet autoimmune destruction. *Immunity*, 28(5), pp.687–97.
- Taub, D. D., Tsarfaty, G., Lloyd, A. R., Durum, S. K., Longo, D. L., & Murphy, W. J. (1994). Growth hormone promotes human T cell adhesion and migration to both human and murine matrix proteins in vitro and directly promotes xenogeneic engraftment. *The Journal of clinical investigation*, 94(1), 293–300.
- Tessem, J.S. et al., 2008. Critical roles for macrophages in islet angiogenesis and maintenance during pancreatic degeneration. *Diabetes*, 57(6), pp.1605–17.
- Trucco, M., 2005. Regeneration of the pancreatic β cell. *Journal of Clinical Investigation*, 115(1), pp.5–12.
- Turk, J. et al., 1993. Biochemical Evidence for Nitric Oxide Formation from Streptozotocin in Isolated Pancreatic Islets. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 197(3), pp.1458–1464.
- Turner, M.S., Kane, L.P. & Morel, P.A., 2009. Dominant role of antigen dose in CD4+Foxp3+ regulatory T cell induction and expansion. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 183(8), pp.4895–903.
- Vasavada, R.C., 2000. Targeted Expression of Placental Lactogen in the Beta Cells of Transgenic Mice Results in Beta Cell Proliferation, Islet Mass Augmentation, and Hypoglycemia. *Journal of Biological Chemistry*, 275(20), pp.15399–15406.
- Wållberg, M. & Cooke, A., 2013. Immune mechanism in type 1 diabetes. *Trends in Immunology*.
- Wang, R., Han, G., Wang, J., Song, L., Chen, G., Xu, R., Li, Y. (2007). The role of STAT3 in antigen-IG inducing regulatory CD4+Foxp3+ T cells. *Cellular Immunology*, 246(2), 103–109.
- Welniak, L. a, Sun, R. & Murphy, W.J., 2002. The role of growth hormone in T-cell development and reconstitution. *Journal of Leukocyte Biology*, 71(3), pp.381–387.
- Whittaker, P.G. & Taylor, K.W., 1980. Direct effects of rat growth hormone in rat islets of langerhans in tissues culture. *Diabetologia*, 18(4), pp.323–8.
- Wicker, L.S., Miller, B.J. & Mullen, Y., 1986. Transfer of autoimmune diabetes mellitus with splenocytes from nonobese diabetic (NOD) mice. *Diabetes*, 35(8), pp.855–60.
- Xing, Y. & Hogquist, K.A., 2012. T-cell tolerance: central and peripheral. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 4(6), p.a006957.
- Yesil, P. & Lammert, E., 2008. Islet dynamics : A glimpse at beta cell proliferation. *Histology and histopathology*, 23, pp.883–895.
- You, S. et al., 2008. Immunoregulatory Pathways Controlling Progression of Autoimmunity in NOD Mice: The Role of CTLA-4 and TGF- β . *Ann NY acad Sci*, pp.300–310.
- Young, E.F. et al., 2010. Islet Lymphocyte Subsets in Male and Female NOD mice are Qualitatively Similar but Quantitatively Distinct. *Autoimmunity*, 42(8), pp.678–691.

- Yuen, K.C.J., Chong, L.E. & Riddle, M.C., 2013. Influence of glucocorticoids and growth hormone on insulin sensitivity in humans. *Diabetic medicine: a journal of the British Diabetic Association*, 30(6), pp.651–63.
- Zheng, S.G., 2013. Regulatory T cells vs Th17: differentiation of Th17 versus Treg, are the mutually exclusive? *American Journal of Clinical Experimental Immunology*, 2(1), pp.94–106.
- Zhu, J., Yamane, H. & Paul, W.E., 2010. Differentiation of effector CD4 T cell populations. *Annual review of immunology*, 28, pp.445–89.
- Zizzo, G. & Cohen, P.L., 2013. IL-17 stimulates differentiation of human anti-inflammatory macrophages and phagocytosis of apoptotic neutrophils in response to IL-10 and glucocorticoids. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 190(10), pp.5237–46.
- Zouali, M., 2001. Immunological Tolerance: Mechanisms. *Encyclopedia of Life Sciences*, (Iddm).

ANEXOS